

DELLYANA RODRIGUES BOBERG

**FORMAS MOLECULARES DA BUTIRILCOLINESTERASE
E OBESIDADE**

CURITIBA

2008

DELLYANA RODRIGUES BOBERG

**FORMAS MOLECULARES DA BUTIRILCOLINESTERASE E
OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Eleidi A. Chautard Freire Maia.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo L. R. de Souza.

CURITIBA

2008

DEDICATÓRIA

Para Clara

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata aos meus pais, pelo incentivo, por proporcionarem mais um passo na minha vida, e por serem pais da Clara nesse período.

À professora Eleidi Chautard Freire Maia, pela dedicação, paciência, e constante orientação, contribuindo imensamente para a realização deste trabalho e para a minha formação acadêmica.

Ao Professor Ricardo Lehtonen de Souza, pela atenção e disponibilidade infinitas no apoio ao trabalho diário do laboratório e por tudo o que me ensinou.

Aos Professores que compõem a banca, Cyntia Fadel Picheth, Thales Cipriani e Vânia Manfredini de Alcântara, pelas correções e sugestões que contribuíram muito para a melhoria deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Ligação e Polimorfismo, pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado e do Departamento de Genética, pela adorável companhia nesses dois anos que passamos juntos.

Às minhas queridas irmãs e minha avó, pelo apoio e carinho que tiveram comigo.

À minha amada filha, pela compreensão da minha ausência e pela alegria que trouxe à minha vida.

RESUMO

A enzima butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica produzida pelo fígado e está distribuída no organismo de forma ampla. Sua função ainda não está completamente definida, no entanto, a BChE já foi associada ao metabolismo de lípidos e a variáveis associadas à obesidade. No sangue humano, existem várias formas moleculares da BChE, como BChE *per se* em monômeros, dímeros, trímeros e tetrameros, ou associada a outras substâncias, como a albumina, formando complexos heterólogos. No presente estudo, foram investigadas as bandas G4 (tetramero), G2 (dímero), G1-ALB (monômero ligado à albumina) e G1 (monômero) da BChE, em plasma humano, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida e quantificação das intensidades relativas pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software*, em uma amostra masculina (145 obesos e 133 não obesos) e outra feminina (56 obesas e 56 não obesas). Foi observado padrão de correlação entre as intensidades relativas dessas bandas, sendo G4 correlacionada negativamente com as demais bandas, G2 correlacionada positivamente com G1-ALB, e não se observou correlação de G1 com G2, tanto em homens como em mulheres. Na amostra de obesos masculinos, a atividade da BChE apresentou associação negativa com G4 e positiva com G1, sendo que G4 diminui sua intensidade relativa quando se passa do genótipo *LL* para *LM+MM* do gene *GHRL* da grelina. No grupo controle, G4 está correlacionada negativamente com a atividade da BChE, tende a ser menos intensa na presença do alelo *-116A* do gene *BCHE* e mais intensa na presença do alelo *539T* deste mesmo gene. Nas análises que consideraram a amostra conjunta de obesos e não obesos masculinos, G4 está correlacionada negativamente com atividade da BChE e com obesidade, G1 está correlacionada positivamente com essas variáveis, enquanto que G2 e G1-ALB apresentam associação positiva apenas com a atividade da BChE. No caso da amostra de mulheres, para a qual não havia informação sobre atividade da BChE, a obesidade se mostrou associada com a intensidade relativa das seguintes bandas: G4 (-), G2 (+), G1-ALB (+) e G1 (+). As correlações negativas independentes das variáveis atividade da BChE e obesidade com G4 e positivas com G1, aliadas à correlação negativa entre G4 e G1 parecem indicar que a associação positiva entre obesidade e atividade da BChE devida, provavelmente, à maior síntese dessa enzima em homens obesos, é acompanhada de maior degradação de G4 em monômeros quando comparados com não obesos.

ABSTRACT

The enzyme butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is a serum esterase synthesized in the liver and found in various parts of the organism. Although the function of BChE is not completely established, it has been associated to lipid metabolism and to variables related to obesity. In human blood many molecular forms of BChE occur, as BChE *per se* in monomers, dimers, trimers and tetramers or associated to other substances, like albumin, forming heterologous complexes. In the present study, the G4 (tetramer), G2 (dimer), G1-ALB (monomer linked to albumin) and G1 (monomer) bands of BChE were investigated by polyacrylamide gel electrophoresis and their relative intensities were quantified by the KODAK ID Image Analysis Software program, in a male (145 obese and 133 non obese men) and in a female (56 obese and 56 non obese women) sample. A pattern of correlation between the relative intensities of these bands was observed in men and women, being G4 negatively correlated with the other bands, G2 positively correlated with G1-ALB and no correlation was seen between G1 and G2 bands. In the male sample, obese individuals showed negative association of BChE activity with G4 and positive association with G1, and G4 diminishes its relative intensity from the *LL* genotype to the *LM+MM* genotype of the *GHRL* gene of ghrelin. In the respective control group, G4 is negatively correlated with BChE activity, tends to be less intense in the presence of the *-116A* allele of the *BCHE* gene and more intense in the presence of the *539T* allele of this same gene. In the analyses that considered the obese and non obese males together, G4 is negatively correlated with BChE activity and with obesity; G1 is positively correlated with these same variables, whereas G2 and G1-ALB showed positive association only with BChE activity. In the case of women for whom no information on BChE activity was available, obesity was associated with the following bands: G4 (-), G2 (+), G1-ALB (+) and G1 (+). The negative independent correlations of the variables BChE activity and obesity with G4 and positive with G1, together with the negative correlation between G4 and G1 seem to indicate that the positive association of obesity with BChE activity due probably to increased synthesis of this enzyme in obese men is accompanied by a greater degradation of G4 into monomers in the obese individuals than in their controls.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>BCHE</i> , MOSTRANDO OS QUATRO EXONS E O NÚMERO DE PARES DE BASES QUE OS COMPÕEM. A REGIÃO COLORIDA CORRESPONDE À PROTEÍNA MADURA.....	19
FIGURA 2 -	FIGURA 2 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>BCHE</i> , MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS -116 NO EXON 1 E 1615 NO EXON 4, QUE FORAM ESTUDADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	23
FIGURA 3 -	ESQUEMA REPRESENTANDO PROCESSOS DE TRANSCRIÇÃO, TRADUÇÃO E PÓS TRADUÇÃO QUE VÃO FORMAR A GRELINA E A OBESTATINA.....	31
FIGURA 4 -	DESENHO ESQUEMÁTICO DO GEL DE POLIACRILAMIDA COM 2 GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO.....	35
FIGURA 5 -	GEL DE POLIACRILAMIDA, MOSTRANDO TRÊS AMOSTRAS APÓS COLORAÇÃO, COM CINCO BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE INDICADAS.....	36
FIGURA 6 -	FIGURA 5 - IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA <i>KODAK</i> MOSTRANDO A CAIXA DE DIÁLOGO <i>ADJUST LANES</i> E AO FUNDO O GEL A SER ANALISADO.....	38
FIGURA 7 -	IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA <i>KODAK</i> MOSTRANDO A CAIXA DE DIÁLOGO <i>ADJUST BANDS</i> E AO FUNDO O GEL COM AS BANDAS SELECIONADAS.....	38
FIGURA 8 -	IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA <i>KODAK</i> MOSTRANDO A DELIMITAÇÃO DAS BANDAS PARA ANÁLISE.....	39
FIGURA 9 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4.....	45
FIGURA 10 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2.....	46
FIGURA 11 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-ALB.....	47
FIGURA 12 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1.....	48
FIGURA 13 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($R = -0,5782$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G2 NO GRUPO DOS OBESOS.....	50
FIGURA 14 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($R = -0,5731$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1-ALB NO GRUPO DOS OBESOS.....	50
FIGURA 15 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($R = -0,7679$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1 NO GRUPO DOS OBESOS.....	51

FIGURA 16 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($R = 0,7819$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1-ALB NO GRUPO DOS OBESOS.....	51
FIGURA 17 -	GRÁFICO MOSTRANDO A FALTA DE CORRELAÇÃO ($R = -0,0024$; $P > 0,50$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1 NO GRUPO DOS OBESOS.....	52
FIGURA 18 -	GRÁFICO MOSTRANDO A FALTA DE CORRELAÇÃO ($R = -0,0638$; $P > 0,45$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G1-ALB E G1 NO GRUPO DOS OBESOS.....	52
FIGURA 19 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($R = -0,6014$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G2 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS.....	53
FIGURA 20 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($R = -0,7476$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1-ALB NO GRUPO DOS NÃO OBESOS.....	53
FIGURA 21 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($R = -0,858$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS.....	54
FIGURA 22 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($R = 0,6802$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1-ALB NO GRUPO DOS NÃO OBESOS.....	54
FIGURA 23 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($R = 0,2212$; $P < 0,05$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS.....	55
FIGURA 24 -	GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($R = 0,320$; $P < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G1-ALB E G1 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	VARIANTES DO GENE <i>BCHE</i> , INCLUINDO A ALTERAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO E O NOME DO ALELO.....	21
TABELA 2 -	VALORES DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC), CLASSIFICAÇÃO DE CATEGORIAS DE PESO CORPORAL E RISCO DE COMORBIDADE.....	26
TABELA 3 -	VOLUMES DOS REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DAS DUAS CONCENTRAÇÕES DO GEL PARA ELETROFORESE.....	36
TABELA 4 -	REAGENTES QUE COMPÕEM A COLORAÇÃO DO GEL PARA DETECÇÃO DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE.....	36
TABELA 5 -	FREQÜÊNCIAS DE OBESOS E CONTROLES NOS QUAIS NÃO FORAM DETECTADAS UMA OU MAIS DAS BANDAS G1, G1-ALB E G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE.....	43
TABELA 6 -	MÉDIAS (M) \pm DESVIOS PADRÕES (DP) DAS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E CONTROLES COM RESULTADOS DE TESTES t E F E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE p.....	44
TABELA 7 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	45
TABELA 8 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	46
TABELA 9 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-ALB DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	47
TABELA 10 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	48
TABELA 11 -	COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, NA AMOSTRA DE 145 OBESOS.....	49
TABELA 12 -	COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, NA AMOSTRA DE 133 CONTROLES.....	49
TABELA 13 -	RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTES À AMOSTRA DE 124 OBESOS, CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE.....	59
TABELA 14 -	RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTES À AMOSTRA DE 125 NÃO OBESOS, CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE	60
TABELA 15 -	RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTE À AMOSTRA TOTAL (N = 249), CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE.....	61
TABELA 16 -	RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTE À AMOSTRA TOTAL (N = 249), CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE.....	62
TABELA 17 -	FREQÜÊNCIAS DE OBESAS E CONTROLES NOS QUAIS AS BANDAS G1-ALB E G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE NÃO FORAM DETECTADAS.....	63

TABELA 18 -	MÉDIAS (M) \pm DESVIOS PADRÕES (DP) DAS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM GRUPOS DE OBESAS E CONTROLES COM RESULTADOS DE TESTES t E F E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE <i>p</i>	64
TABELA 19 -	DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	64
TABELA 20 -	DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE, EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	65
TABELA 21 -	DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-ALB DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	65
TABELA 22 -	DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS.....	66
TABELA 23 -	COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (<i>r</i>) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, NA AMOSTRA DE 56 OBESAS.....	66
TABELA 24 -	COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (<i>r</i>) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, EM 56 CONTROLES.....	66
TABELA 25 -	RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTE À AMOSTRA FEMININA, CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE.....	68
TABELA 26 -	VALORES DE MÉDIAS DE ATIVIDADE ABSOLUTA EM KU/I (AA), OBTIDOS DA MULTIPLICAÇÃO DA ATIVIDADE MÉDIA DA BUTIRILCOLINESTERASE NO PLASMA EM OBESOS (6,4 KU/I) E NÃO OBESOS (4,55 KU/I) PELA MÉDIA DA INTENSIDADE RELATIVA (IR) DE CADA BANDA DESSA ENZIMA, RESPECTIVAMENTE.....	74

LISTA DE SIGLAS

AChE	-Acetilcolinesterase
<i>ACHE</i>	-Gene da acetilcolinesterase
BChE	-Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	-Gene da butirilcolinesterase
<i>CHE2</i>	-Loco condicionador do complexo C ₅ da butirilcolinesterase
CONEP	-Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CT	-Colesterol total
CV	-Coeficiente de Variação
Cys (C)	-Cisteína
DTNB	-Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico
G1	-Monômero da butirilcolinesterase
G1-ALB	-Monômero da butirilcolinesterase associado à albumina
G2	-Dímero da butirilcolinesterase
G4	-Tetrâmero da butirilcolinesterase
<i>GHRL</i>	-Gene da grelina
HEMEPAR	-Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
IBGE	-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	-Índice de massa corporal
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	-nucleotídeo
OMS	-Organização Mundial da Saúde
RCQ	-Razão/cintura quadril
TBE	-Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	-N,N,N',N'-Tetra metiletilenodiamina
UFPR	-Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	17
2.2 FORMAS MOLECULARES DA BCHE.....	18
2.3 O GENE <i>BCHE</i>	19
2.4 LOCO <i>CHE2</i>	20
2.5 VARIABILIDADE DO GENE <i>BCHE</i>	20
2.5.1 Variações dos exons 1 e 4 do gene <i>BCHE</i>	23
2.6 OBESIDADE.....	25
2.6.1 Genes e obesidade.....	26
2.6.2 Butirilcolinesterase, IMC e obesidade.....	27
2.6.2.1 Complexo G1-ALB e obesidade.....	28
2.6.2.2 Variações dos exons 1 e 4 do gene <i>BCHE</i> e IMC.....	29
2.6.2.3 Grelina e obesidade.....	29
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 JUSTIFICATIVA.....	33
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1 MATERIAL.....	34
5.2 METODOLOGIA.....	35
5.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção das bandas G4, G2, G1-ALB e G1.....	35
5.2.2 Coloração do gel.....	36
5.2.3 Análise de densitometria ótica pelo programa KODAK ID Image Analysis Software.....	37
5.2.4 Coeficiente de variação da técnica.....	39
5.2.5 Medida da atividade da BChE.....	40
5.2.6 Análise estatística.....	41
6 RESULTADOS.....	43
6.1 ANÁLISE DAS BANDAS G1, G1-ALB, G2 E G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM HOMENS.....	43

6.1.1 Análises entre as intensidades relativas das bandas da butirilcolinesterase e as variáveis estudadas.....	56
6.2 ANÁLISE DAS BANDAS G1, G1-ALB, G2 E G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM MULHERES.....	63
7 DISCUSSÃO.....	69
7.1 INVESTIGAÇÃO DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE.....	69
7.2 RELAÇÕES ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE.....	71
7.3 RELAÇÕES ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE E AS VARIÁVEIS ANALISADAS.....	72
7.4 INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE E OBESIDADE.....	75
8 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A enzima butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), anteriormente chamada de colinesterase do soro ou pseudocolinesterase, é uma esterase sérica produzida pelo fígado, e está distribuída no organismo de forma ampla (WESCOE *et al.*, 1947). A BChE desempenha importante papel na hidrólise de ésteres de colina, utilizando a butirilcolina como substrato preferencial (WHITTAKER, 1980), no entanto ainda não está definida sua função fisiológica, bem como seu substrato natural.

A butirilcolinesterase é uma enzima polimórfica, e é codificada pelo gene *BCHE*, que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2), e é constituído de quatro exons (ARPAGAUS *et al.*, 1990). Mas a BChE também pode apresentar variação genética, devido ao loco *CHE2*, responsável pela formação do complexo C₅, que é a BChE ligada a um composto ainda não identificado, que origina uma banda extra detectada em eletroforese (HARRIS *et al.*, 1962). O loco *CHE2* apresenta os alelos *CHE2**C₅⁺, que caracteriza a presença do complexo C₅, e *CHE2**C₅⁻, a ausência deste.

Essa enzima apresenta-se no sangue humano em várias formas moleculares, podendo estar apenas como BChE – em monômeros (G1), dímeros (G2), trímeros (G3) e tetrâmeros (G4); ou associada a outras substâncias, como a albumina, compondo assim formas heterólogas. Juul (1968) detectou 12 bandas da BChE em eletroforese de poliácridamida, o que nos permite deduzir uma possível existência de 8 formas heterólogas dessa enzima. Três dessas formas já foram estudadas: o complexo do monômero associado à albumina (G1-ALB) e o tetrâmero ligado a uma substância ainda não identificada, formando o complexo C₅, ambos descritos por Harris *et al.* (1962), e a forma C_{4/5}, descrita por Souza *et al.* (2003), na qual a BChE está ligada à substância ainda não determinada. Um complexo formado pela BChE e transferrina foi descrito em soro de galinha (WEITNAUER *et al.*, 1999).

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no corpo. Esse acúmulo pode estar associado a um aumento da ingestão de alimento, juntamente à diminuição do gasto de calorias, ou ainda a uma predisposição genética. Diversos estudos já identificaram locos relacionados à obesidade em todos os autossomos e no cromossomo X.

Kutty (1980) correlacionou a atividade da BChE com a obesidade, e Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991) e Alcântara *et al.* (2001a; 2003) encontraram correlação entre a atividade de formas heterólogas da BChE com peso e IMC, sugerindo uma provável função dessa enzima no metabolismo de lípidos.

Este trabalho retoma estudos realizados por Cipriani *et al.* (1999) que detectou falta de G1-ALB e menor atividade desse complexo em obesos, quando comparados aos não obesos, para avaliar o comportamento do complexo G1-ALB, bem como das formas homólogas G1, G2 e G4 da BChE, em relação à obesidade, utilizando outras técnicas e, ainda, acrescenta informações sobre as variações dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS

As colinesterases são esterases que hidrolisam ésteres de colina. No sangue humano existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). Estas colinesterases têm muita similaridade, embora possam ser distinguidas pela especificidade do substrato e sensibilidade à inibição por organofosfatos, sendo a BChE mais sensível a esse tipo de inseticida que a AChE (STURM, 2000). Além disso, a AChE é inibida por altas concentrações do substrato acetilcolina, e a BChE tem sua atividade aumentada nessas condições (ALLES e HAWES, 1940).

A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) é também chamada de colinesterase verdadeira, e existe em diferentes formas moleculares. Ocorre na membrana eritrocitária, na placa motora de músculos esqueléticos e em áreas do cérebro sem função colinérgica. É responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas (LEHNINGER, 2002).

A butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), antes chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase e colinesterase não específica, é sintetizada pelas células hepáticas, e encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE *et al.*, 1947). Hidrolisa vários ésteres de colina, e também outros ésteres, como ácido acetilsalicílico (HARRIS, 1980), sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina.

A butirilcolinesterase do soro tem um papel chave na hidrólise do relaxante muscular succinilcolina que é administrado durante a anestesia (KALLOW e GUNN, 1959). Pacientes portadores de variantes genéticas da BChE, como por exemplo a *D70G*, podem sofrer apnéia prolongada quando submetidos a doses padrões dessa droga. No entanto, a função fisiológica desta enzima e seu substrato natural permanecem desconhecidos.

2.2 FORMAS MOLECULARES DA BUTIRILCOLINESTERASE

Após eletroforese bi-dimensional em papel filtro e em gel de amido pH 8,6, é possível verificar as cinco formas moleculares principais da butirilcolinesterase existentes no organismo humano: monômero (C_1), dímero (C_3) e tetrâmero (C_4), e também o monômero ligado à albumina sérica (C_2) e o tetrâmero ligado à uma substância desconhecida (C_5).

Existe uma outra nomenclatura da BChE, que é baseada na estrutura molecular e não na mobilidade eletroforética. Esta nomenclatura é fundamentada no número de subunidades moleculares e no fato delas serem globulares. A forma C_1 corresponde à forma globular monomérica, sendo denominada de G1, o dímero C_3 é denominado G2 e o tetrâmero C_4 de G4. Um trímero, relatado por Masson (1979), de mobilidade intermediária entre C_3 e C_4 , formado a partir de C_4 submetido à tripsina, é designado de G3. O monômero ligado à albumina é referido como G1-ALB. Essa será a nomenclatura adotada nesse estudo.

G1 é formado por uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos e nove cadeias laterais de oligossacarídeos ligadas a nove asparaginas, e o peso molecular é de cerca de 90.000 Da. E os dímeros (G2) são formados pela união de monômeros por uma ligação dissulfeto intercadeias (LOCKRIDGE *et al.*, 1987).

O tetrâmero é a forma mais abundante da BChE no plasma. É uma molécula tetramérica globular, com peso molecular de aproximadamente 340.000 Da. Tem quatro subunidades idênticas arranjadas como dímero de dímeros, isto é, pares de subunidades são covalentemente ligadas através de uma única ligação dissulfeto dentro dos dímeros, e dois desses dímeros são hidrofobicamente ligados dentro do tetrâmero (LOCKRIDGE e LA DU, 1982). As formas moleculares G1, G2 e G4 são parcialmente interconversíveis e as formas G1 e G2 podem ser precursoras e/ou produto da degradação de G4 (LA MOTTA *et al.*, 1968; MASSON, 1979).

A BChE também apresenta-se no sangue humano em formas heterólogas, nas quais está associada com outras substâncias. Masson (1989, 1991) evidenciou a estrutura do complexo formado pela associação do monômero da BChE com a albumina, proteínas que se ligam por uma ponte dissulfeto (Cys – 571 da BChE e Cys – 34 da albumina). O centro ativo da subunidade da butirilcolinesterase é parcialmente encoberto pela molécula de albumina. A formação do conjugado

butirilcolinesterase-albumina (G1-ALB) muito provavelmente ocorre nas células hepáticas e não no plasma.

2.3 O GENE *BCHE*

Arpagaus *et al.* (1990) mostraram evidências da existência de um único gene que codifica a BChE e determinaram sua estrutura.

O gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) tem 64.559 pb desde o início do exon 1 até o sítio CA de poliadenilação (NCBI, *on-line*, 2006). É formado por quatro exons. O exon 1 (149 pb) contém as seqüências não traduzidas, e dois potenciais sítios de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2 (1.525 pb) contém 83% da seqüência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, a serina do sítio ativo e um terceiro possível sítio de início de tradução, no códon -28. O primeiro códon que codifica para o peptídeo maduro é numerado como +1 e está localizado no exon 2. O exon 3 possui 167 pb. O exon 4 (604 pb) codifica para a extremidade C-terminal da proteína e apresenta a região 3' não traduzida que possui dois sinais de poliadenilação. O intron 1 tem 6.272 pb, o intron 2 tem 43.205 pb e o intron 3 tem 12.638 pb. A Figura 1 mostra um desenho esquemático do gene *BCHE*.

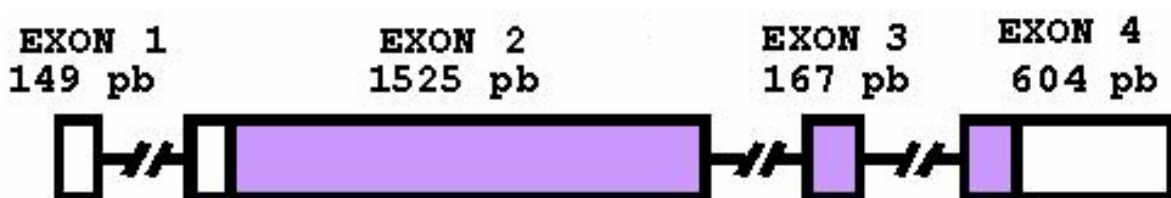


FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE *BCHE*, MOSTRANDO OS QUATRO EXONS E O NÚMERO DE PARES DE BASES QUE OS COMPÕEM. A REGIÃO COLORIDA CORRESPONDE À REGIÃO CODIFICADORA PARA A PROTEÍNA MADURA.

Como a BChE é formada por 574 resíduos de aminoácidos, apenas 1722 pares de bases codificam para a enzima madura. Os outros 723 pares de bases correspondem ao exon 1, à parte inicial do exon 2 e à parte final do exon 4.

Jbilo *et al.* (1994) analisaram a região regulatória, a montante da região codificadora, e identificaram o sítio de início de transcrição, que se encontra a 157 pb a montante da Met⁻²⁸, sítio de início de tradução. O seqüenciamento dessa região permitiu a identificação de vários sítios de ligação para fatores de transcrição que poderiam promover a expressão do gene no início do desenvolvimento e durante a

proliferação celular. Foram encontrados sítios de ligação para o fator de transcrição AP1 e múltiplos sítios para Oct-1, PEA-3 e topoisomerases.

2.4 O LOCO *CHE2*

A detecção da variabilidade desse loco é feita por eletroforese em gel de agarose. Os fenótipos *CHE2* C5⁺ e *CHE2* C5⁻ apresentam ou não a banda C₅, respectivamente (HARRIS *et al.*, 1962). Esses autores encontraram essa banda em apenas 4,6% da amostra, sendo o gene responsável pela sua determinação chamado de *CHE2* (2q33-35).

Masson (1991) sugere que C₅ (denominação ainda conservada) seja uma banda híbrida, formada pelo tetrâmero G4 associado a outra proteína (X). Eletroforese em gel de poliacrilamida e comparação com um padrão de peso molecular mostraram que o peso molecular de C₅ é de 400 kDa. Este valor de 400 kDa é 60 kDa maior que o peso molecular de G4, de modo que essa diferença pode ser atribuída à proteína X que se liga a G4 para a formação de C₅. Contudo, o produto do loco *CHE2* ainda não foi identificado.

Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991) encontraram o fenótipo *CHE2* C5⁺ com frequência de 10,3%, em amostra da população de Curitiba. Alcântara *et al.* (2001b) analisando dados diferenciais dos fenótipos *CHE2* C5⁺ e *CHE2* C5⁻, em relação ao IMC, sugerem a influência do loco *CHE2* no metabolismo de lípidos. Furtado (2005) verificou que o fenótipo *CHE2* C5⁺ é menos freqüente no grupo de obesos que em seus controles de peso normal, sugerindo que esse fenótipo tem efeito protetor em relação à obesidade. Alcântara (2000a), considerando que o alelo *CHE2**C5⁺ apresenta, em geral, frequência bastante inferior à do alelo *CHE2**C5⁻, inferiu que esse fato poderia estar relacionado com menor valor adaptativo do fenótipo *CHE2* C5⁺, em populações primitivas, nas quais a maior reserva de gordura seria mais vantajosa.

2.5 VARIABILIDADE DO GENE *BCHE*

A variabilidade genética da enzima butirilcolinesterase começou a ser revelada desde a década de 50, quando se verificou que os indivíduos diferiam na sua capacidade de hidrolisar a succinilcolina, um relaxante muscular hidrolisável

pela BChE. A primeira enzima variante descrita (atípica; *D70G*) não consegue hidrolisar esse relaxante, em doses farmacológicas, o que causa paralisia muscular e apnéia prolongada nos pacientes. McGuire *et al.* (1989) mostraram que o alelo atípico *D70G* resulta de uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 (exon 2), levando a uma substituição do ácido aspártico 70 (GAT) por glicina (CGT). Neste mesmo trabalho, a frequência do alelo *D70G* foi estimada em cerca de 2% em populações caucasóides. Mikami *et al.* (2008) encontraram valor semelhante (1,80%) em doadores de sangue euro-brasileiros da população de Curitiba. Atualmente, mais de 65 variantes já foram descritas (Tabela 1).

TABELA 1 - VARIANTES DO GENE *BCHE*, INCLUINDO A ALTERAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO E O NOME DO ALELO

Posição do nucleotídeo	Nome ^a	Referência
Exon 1		
-116; G→A		BARTELS <i>et al.</i> , 1990
Exon 2		
9-11; CATCAT→CAT	<i>I4del</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> , 1997
16; ATT→TT	<i>I6fs</i>	BARTELS <i>et al.</i> , 1992; PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
35; AAA→AGA	<i>K12R</i>	MIKAMI <i>et al.</i> , 2008
45; GGG→GGC	<i>G15G</i>	MIKAMI <i>et al.</i> , 2008
71; ACG→ATG	<i>T24M</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> , 1997
82; TTT→ATT	<i>F28I</i>	YEN <i>et al.</i> , 2003
98; TAT→TGT	<i>Y33C</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
109; CCT→TCT	<i>P37S</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
208; GAT→CAT	<i>D70H</i>	BOECK <i>et al.</i> , 2002
209; GAT→GGT	<i>D70G (A)</i>	MCGUIRE <i>et al.</i> , 1989
223; GGC→CGC	<i>G75R</i>	SOUZA <i>et al.</i> , 2005
270; GAA→GAC	<i>E90D</i>	SOUZA <i>et al.</i> , 2005
286; AAT→TAT	<i>N96Y</i>	YEN <i>et al.</i> , 2003
297; ATT→ATG	<i>I99M</i>	SOUZA <i>et al.</i> , 2005
298; CCA→TCA	<i>P100S</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> ; TAKAGI <i>et al.</i> ; LU <i>et al.</i> , 1997
318; AAT→AAAT	<i>N106fs</i>	YEN <i>et al.</i> , 2003; ON-KEI CHAN <i>et al.</i> , 2005
344; GGT→GAT	<i>G115D</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1997
351; GGT→GGAG	<i>G117fs</i>	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 1990
355; CAA→TAA	<i>Q119X</i>	SUDO <i>et al.</i> , 1996
375; TTA→TTT	<i>L125F</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
383; TAT→TGT	<i>Y128C</i>	HIDAKA <i>et al.</i> , 1997
424; GTG→ATG	<i>V142M (H)</i>	JENSEN <i>et al.</i> , 1992
486; GCT→GCC	<i>A162A</i>	SOUZA <i>et al.</i> , 2005
510; GAT→GAG	<i>D170E</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
514; CAG→TAG	<i>Q172X</i>	GÄTKE <i>et al.</i> , 2001
551; GCC→GTC	<i>A184V (SC)</i>	GREENBERG <i>et al.</i> , 1995
592; AGT→GGT	<i>S198G</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
596; GCA→GTA	<i>A199V</i>	SAKAMOTO <i>et al.</i> , 1998
601; GCA→ACA	<i>A201T</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996

continua

Posição do nucleotídeo	Nome ^a	Referência
607; TCA→CCA	<i>S203P</i>	HIDAKA <i>et al.</i> , 2001
728; ACG→ATG	<i>T243M (F-1)</i>	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 1992
748; ACT→CCT	<i>T250P</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> , 1995
765; GAG→GAC	<i>E255D</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
800; AAA→AGA	<i>K267R</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> , 1997
811; GAA→TAA	<i>E271X</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
880; GTG→ATG	<i>V294M</i>	MIKAMI <i>et al.</i> , 2008
943; ACC→AACC	<i>T315fs</i>	HIDAKA <i>et al.</i> , 1992
943; ACC→TCC	<i>T315S</i>	LIU <i>et al.</i> , 2002
988; TTA→ATA	<i>L330I</i>	SUDO <i>et al.</i> , 1997
997; GGT→TGT	<i>G333C</i>	MIKAMI <i>et al.</i> , 2008
1062 – 1076	<i>K355insALU</i>	MURATANI <i>et al.</i> , 1991; MAEKAWA <i>et al.</i> , 2004
1093; GGA→CGA	<i>G365R</i>	HIDAKA <i>et al.</i> , 1992; HADA <i>et al.</i> , 1992
1156; CGT→TGT	<i>R386C</i>	YEN <i>et al.</i> , 2003
1169; GGT→GTT	<i>G390V (F-2)</i>	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 1992
1200; TGC→TGA	<i>C400X</i>	HIDAKA <i>et al.</i> , 1997
1253; TTC→TCC	<i>F418S</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> , 1995
1270; CGA→TGA	<i>R424X</i>	YEN <i>et al.</i> , 2003
1273; TCC→CCC	<i>S425P</i>	GNATT <i>et al.</i> , 1990
1294; GAA→TAA	<i>E432X</i>	LEVANO <i>et al.</i> , 2005
1303; GGA→AGA	<i>G435R</i>	DEY <i>et al.</i> , 1997
1336; TTT→GTT	<i>F446V</i>	DEY <i>et al.</i> , 1998
1351; GAA→TAA	<i>E451X</i>	DEY <i>et al.</i> , 1998
1378; GAG→AAG	<i>E460K</i>	YEN <i>et al.</i> , 2003
1393; AGA→TGA	<i>R465X</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> , 1995
1408; CGG→TGG	<i>R470W</i>	MIKAMI <i>et al.</i> , 2008
1411; TGG→CGG	<i>W471R</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
1420; TTT→CTT	<i>F474RL</i>	ON-KEI CHAN <i>et al.</i> , 2005
Intron 2		
IVS2–8T→G		PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
Exon 3		
1490; GAA→GTA	<i>E497V (J)</i>	BARTELS <i>et al.</i> , 1992
1500; TAT→TAA	<i>Y500X</i>	BARTELS <i>et al.</i> , 1992; PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
1543; CGT→TGT	<i>R515C</i>	MAEKAWA <i>et al.</i> , 1995
1553; CAA→CTA	<i>Q518L</i>	PRIMO-PARMO <i>et al.</i> , 1996
Exon 4		
1615; GCA→ACA	<i>A539T (K)</i>	BARTELS <i>et al.</i> , 1992
1914 A→G		BARTELS <i>et al.</i> , 1990

^anome comum entre parênteses

Fonte: CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA (2007).

Primo-Parmo (1993) propôs que fossem chamadas de silenciosas as variantes com atividade inferior a 10% da atividade da enzima usual, incluindo ausência total de atividade. No laboratório de Polimorfismo e Ligação da UFPR, onde este trabalho foi desenvolvido, foram encontradas três mutações que alteram a atividade específica da BChE: *E90D*, caracterizada como sem atividade; *G75R* com 45% da

atividade usual (SOUZA *et al.*, 2005b; MIKAMI *et al.*, 2008); e G333C com 20% dessa atividade (MIKAMI *et al.*, 2008).

2.5.1. Variações dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*

Bartels *et al.* (1990) descreveram a existência de dois polimorfismos na região não codificadora do gene *BCHE*, um na posição nt -116 (TGC/TAC) no exon 1 e o outro na posição nt 1914 (A/G), 189 bases depois do códon de parada no exon 4. No nt -116, a frequência de G é 0,92 e de A é de 0,08, já no nt 1914, a frequência de A é 0,74 e de G é 0,26. Esses dois polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação: -116A tem sempre aparecido com 1914G. Ainda nesse mesmo trabalho, os autores evidenciaram que a mutação *K* do exon 4 está preferencialmente na combinação cis com o 1914G e -116A, em vista do desequilíbrio de ligação. A Figura 2 mostra um desenho esquemático da localização das mutações estudadas no presente tabalho.

A enzima variante *K* é causada por uma mutação de ponto de guanina para adenina no nucleotídeo 1615 (G→A), no exon 4, levando a uma mudança no aminoácido alanina 539 para treonina (A539T). A mutação *K* encontra-se preferencialmente em cis com a variante atípica do nucleotídeo 209, com valor de desequilíbrio de ligação relativo (D') de 89% (BARTELS *et al.* 1992).

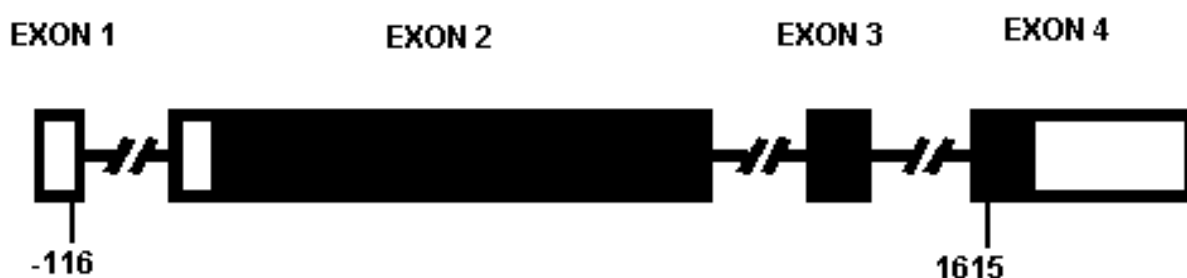


FIGURA 2 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE *BCHE*, MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS -116 NO EXON 1 E 1615 NO EXON 4, QUE FORAM ESTUDADOS NO PRESENTE TRABALHO.

A mutação *K* da BChE humana foi associada à redução de 30% no número de moléculas circulantes dessa enzima (RUBINSTEIN *et al.*, 1978), sendo proposto que esta redução fosse devida a menores níveis de síntese ou à degradação acelerada. De acordo com Altamirano *et al.* (2000), a mutação *K* não parece ter efeito na estrutura ou atividade da BChE, pois a enzima com essa mutação não apresentou diferenças quando comparada com a BChE usual, em relação à

afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula ou formação sérica de tetrâmeros. Os autores sugerem que o decréscimo no número de moléculas circulantes da BChE, associado ao fenótipo K, pode ser causado por outra mutação na região regulatória ou promotora do gene *BCHE*.

Furtado (2005) investigou, em amostra de obesos e controles, a presença do polimorfismo G→A na posição -116 no exon 1 do gene *BCHE*. Este estudo foi o primeiro relato, em população brasileira, desse polimorfismo, originalmente identificado por Bartels *et al.* (1990). Neste trabalho, a autora determinou a atividade da BChE em obesos e controles classificados de acordo com o genótipo relativo aos alelos -116A e -116G do exon 1, e constatou que o genótipo -116G/-116A está associado a uma diminuição da atividade da BChE. A autora também realizou análises levando em conta as mutações K e -116A, visto que estão em desequilíbrio de ligação. Foi observado que a atividade da BChE era menor somente nos indivíduos portadores da mutação -116A, pois não foi verificada diminuição da atividade enzimática nos indivíduos portadores apenas da mutação K. Apesar da mutação -116A não ocorrer na região codificadora do peptídeo maduro, pertence a uma região transcrita do gene *BCHE*, podendo ser responsável pela diminuição da atividade da BChE, pois ocorre em região de transcrição, que pode estar associada à regulação da expressão do gene.

Esses dados em conformidade com os obtidos por Altamirano *et al.* (2000), modificaram a conclusão antes proposta por Rubinstein *et al.* (1978), de que a mutação K seria responsável pela diminuição na atividade da BChE.

Furtado *et al.* (2008) analisaram a atividade da BChE e a variabilidade da região do exon 1 que contém o sítio -116, em homens euro-brasileiros separados em três grupos: obesos, IMC normal, e apresentando atividade baixa da BChE ($\leq 4,00$ KU/l). A frequência do alelo -116A foi significativamente mais alta no grupo de atividade baixa que nos outros dois grupos. A frequência desse alelo foi mais alta também no quartil de atividade mais baixa, para obesos e indivíduos com IMC normal, quando comparado com o quartil de atividade mais alta da BChE, tanto em obesos como no grupo de peso normal. Sugeriram, então, que o alelo -116A está associado a uma diminuição na atividade da BChE nessas amostras, provavelmente devido a eventos de regulação transcricional ou traducional.

Em doadores de sangue de Curitiba, Souza *et al.* (1998) encontraram o alelo K com frequência de cerca de 18% e Furtado (2005) encontrou frequência de cerca 9% do alelo -116A.

2.6 – OBESIDADE

A obesidade se define por um armazenamento excessivo de gordura no organismo. Esse acúmulo funciona como um estoque para o organismo, visto que os nutrientes não utilizados para produção imediata de energia são armazenados em forma de gordura para utilização posterior.

Mecanismos homeostáticos regulam a relação entre ingestão de comida e gasto energético, buscando manter a massa adiposa relativamente estável. No entanto, esses mecanismos parecem atuar de forma mais eficiente no sentido de possibilitar que o volume de massa adiposa seja facilmente excedido. Com isso, os mecanismos fisiológicos tendem a ser mais eficientes na prevenção da perda de peso, que no seu ganho demasiado. Essa reflexão pode ser relacionada à teoria do genótipo frugal (*thrifty genotype*), proposta por Neel (1962), que diz que os alelos que promoviam maior depósito de energia foram selecionados favoravelmente, pois contribuíam para aumentar a sobrevivência dos indivíduos em longos períodos de subnutrição.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugeriu uma classificação do sobrepeso e obesidade em adultos, baseada no Índice de Massa Corporal (IMC), obtido pela razão entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros, com $IMC > 25$ definindo sobrepeso e $IMC \geq 30$ definindo obesidade, conforme indicado na Tabela 2. Além disso, estudos considerando os riscos associados à obesidade tornam-se mais precisos, levando em conta também o padrão de acúmulo de gordura intra-abdominal, através de medidas da circunferência da cintura e da razão cintura/quadril, fatores associados à dieta, estilo de vida e etnia.

Segundo o estudo *Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde*, feito pela Organização Mundial de Saúde (*on-line*, 2007), a obesidade já atingiu proporções globais, com mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, sendo pelo menos 300 milhões clinicamente obesos. Entre as crianças abaixo de 5 anos, o número de obesos é de 17,6 milhões. As causas essenciais dessa epidemia crescente de obesidade são a

queda na atividade física e um aumento no consumo de alimentos hipercalóricos e ricos em gordura. A obesidade é responsável por 2 a 6% do custo total de atenção à saúde em vários países em desenvolvimento; algumas estimativas apontam para até 7%. Os verdadeiros custos são indubitavelmente muito mais altos, uma vez que nem toda patologia associada à obesidade é incluída nos cálculos. O IMC acima do ideal contribui para 58% do diabetes, 21% das cardiopatias isquêmicas e entre 8% e 42% de certos tipos de câncer.

TABELA 2 - VALORES DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC), CLASSIFICAÇÃO DE CATEGORIAS DE PESO CORPORAL E RISCO DE COMORBIDADE

Categoria de peso	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidade
Abaixo do peso	IMC < 18,5	Baixo
Peso normal	18,5 ≤ IMC < 25	Médio
Pré-obeso (excesso de peso)	25 ≤ IMC < 30	Aumentado
Obesidade classe I (obesidade leve)	30 ≤ IMC < 35	Moderado
Obesidade classe II (obesidade grave)	35 ≤ IMC < 40	Grave
Obesidade classe III (obesidade mórbida)	IMC ≥ 40	Muito grave

No Brasil, de acordo com *Pesquisa de Orçamentos Familiares*, realizada em 2002 e 2003 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE *on-line*, 2006), estima-se que cerca de 40% dos indivíduos adultos do país apresentam excesso de peso, não havendo diferença substancial entre homens e mulheres. Já a obesidade afeta 8,9% dos homens adultos e 13,1% das mulheres adultas do país.

Indivíduos obesos e com sobrepeso estão mais sujeitos a apresentarem doenças, como câncer de mama, de cólon, de rim e de vesícula, hipertensão, doença arterial coronariana e diabetes *mellitus* do tipo II. Doenças essas que alcançam graves dimensões sociais e psicológicas, podendo afetar qualquer faixa etária e classe social.

2.6.1 Genes e obesidade

A obesidade é uma doença complexa, suas formas comuns são poligênicas e multifatoriais. Os genes de predisposição a esta doença interagem entre si e com o

ambiente de diferentes formas, com isso, a pressão ambiental pode exceder a capacidade de adaptação homeostática em pessoas geneticamente predispostas, levando a um desequilíbrio energético e favorecendo a estocagem de gordura (FROGUEL *et al.*, 2000). Os genes de suscetibilidade não são necessariamente requeridos para o desenvolvimento dessa doença, mas podem aumentar o risco de sua manifestação, sobretudo quando essa suscetibilidade genética está aliada a uma alimentação altamente calórica e ao sedentarismo. Até hoje não existe consenso a respeito do grau de herdabilidade da obesidade, provavelmente em decorrência da natureza complexa dessa doença, e também porque a herdabilidade pode variar de população para população.

Perusse *et al.* (2005) relataram que já foram identificados locos relacionados à obesidade em todos os autossomos e no cromossomo X, bem como 600 casos de genes, marcadores e regiões cromossômicas ligados ou associados à obesidade humana, e foram descritas 69 mutações em um único gene, que podem explicar os casos de obesidade patológica humana. Ainda no mesmo trabalho foi mapeada a maioria das formas sindrômicas da obesidade, como Prader-Willi (15q11.2), Cohen (8q22.2), Alstrom (2p13.1), Bardet-Biedl (11q13.1) e síndromes de resistência à insulina (19p13.3), mas, embora tenham sido identificados genes candidatos, os genes responsáveis ainda não foram isolados, pois a raridade dessas mutações torna difícil a busca por esses genes.

2.6.2 Butirilcolinesterase, IMC e obesidade

Embora o papel fisiológico da BChE seja ainda desconhecido, sua participação no metabolismo de lípidos, bem como associação ao IMC, foi evidenciada em vários estudos. Um aumento na atividade da BChE é usualmente observado como consequência de distúrbios associados com o metabolismo anormal de lípidos, como na hiperlipoproteinemia, caracterizada pelo aumento de triglicérides e/ou colesterol, excesso de ácidos graxos derivado do metabolismo de carboidratos, obesidade e diabetes (KUTTY, 1980).

Por outro lado, indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ apresentam, em média, menor peso quando comparados a seus controles CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991) e menor IMC (ALCÂNTARA *et al.*, 2001b) do que indivíduos de fenótipo CHE2 C5-, sugerindo que a presença do complexo C₅, que determina

geneticamente aumento da atividade da BChE, poderia levar a uma menor estocagem de gordura.

Investigando essa associação da BChE e IMC em indivíduos obesos e não obesos de fenótipo CHE2 C5–, Alcântara *et al.* (2003) verificaram que os obesos apresentavam atividade média da BChE maior que os controles. Quando estudaram os obesos CHE2 C5+, esses autores inferiram que alelo *CHE2**C5+ pode predispor a uma facilidade para perder peso, pois observaram uma frequência maior de indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ (56%) que perderam peso, do que aqueles com o fenótipo CHE2 C5– (21,6%).

2.6.2.1 Complexo G1-ALB e Obesidade

Alcântara *et al.* (1999) e Cipriani *et al.* (1999), estudando a participação das formas moleculares da BChE em obesos e não obesos, verificaram a ocorrência de menor frequência de G1-ALB nos obesos em relação aos controles (69% e 100%, respectivamente). Os obesos também apresentaram menor média de atividade relativa dos dímeros e de G1-ALB, quando comparados por teste t, com os não obesos. O IMC dos obesos está correlacionado negativamente com G1-ALB, tendo os autores justificado esse resultado como devido aos altos níveis de ácidos graxos livres no sangue de obesos, a maioria dos quais ligados à albumina.

Analisando variáveis de características gerais, antropométricas e bioquímico-hormonais nos obesos de fenótipo CHE2 C5–, com e sem G1-ALB, Alcântara *et al.* (2000b) observaram que obesos sem esse complexo apresentavam valores médios significativamente maiores de razão cintura/quadril (RCQ de 0,94) e colesterol total (CT de 210,4 mg/dl), e menor valor médio de estradiol (E₂ de 55,6 pg/ml), quando comparados com os obesos com esse complexo (respectivamente: 0,89; 188,0 mg/dl; 112,6 pg/ml). Esses resultados foram interpretados como indicativos de maior risco de doenças cardiovasculares nos obesos que não apresentam G1-ALB, do que naqueles que o possuem. Os mesmos autores, em trabalho complementar subsequente (ALCÂNTARA *et al.*, 2001a), analisando não obesos e obesos (com e sem G1-ALB) em relação às variáveis acima mencionadas, verificaram também que os obesos apresentam, em média, menor atividade relativa de G1-ALB do que os não obesos; que apenas 75% dos obesos apresentaram G1-ALB, diferindo dos não

obesos (100%), e que obesos com e sem G1-ALB não diferem quanto ao nível médio de albumina.

2.6.2.2 Variações dos exons 1 e 4 do gene *BCHE* e IMC

Souza *et al.* (2005a) verificaram que os genótipos referentes à mutação *K* (A539T) não estavam homogeneamente distribuídos em uma amostra da população de Curitiba, classificada em dois grupos quanto ao IMC: extremo ($IMC \geq 30$ e $IMC < 20$) e não extremo, verificando uma frequência mais alta do genótipo 539AT no grupo com IMC extremo. Neste mesmo trabalho, verificaram ainda variância de IMC significativamente maior no genótipo 539AT, em relação ao genótipo 539AA.

Andrade *et al.* (2008), utilizando a amostra de Souza *et al.* (2005a), compararam 3 classes genotípicas referentes aos exons 1 e 4 (-116GA;539AT, -116GG;539AA, -116GG/539AT), quanto à variância do IMC, e observaram variância significativamente maior na classe genotípica -116GA;539AT, quando comparada com as outras classes. Como a distribuição do IMC não diferiu entre os genótipos -116GG/539AT e -116GG;539AA, quanto à variância, conclui-se que a presença do alelo -116A é necessária para o aumento da variância do IMC.

2.6.2.3 Grelina e obesidade

A grelina é um hormônio peptídico produzido principalmente por células da mucosa do estômago (DATE *et al.*, 2000). É um ligante endógeno do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R), que estimula a secreção do hormônio do crescimento (GH) a partir da pituitária. A grelina é formada por 28 aminoácidos, e o terceiro aminoácido, usualmente uma serina, é modificado por um ácido graxo, e essa modificação (octanoilização) é essencial para a sua atividade (KOJIMA *et al.*, 2001).

No soro, a grelina está, em sua maioria, desoctanoilada (desacilada), sendo incapaz de se ligar ao receptor GHS-R e realizar sua função endócrina. Mas uma outra forma circulante da grelina pode ser encontrada, em que está acilada, ou seja, contém o ácido n-octanóico na Ser3, permitindo sua ligação ao receptor GHS-R e a conseqüente secreção do hormônio do crescimento.

De acordo com De Vriese *et al.* (2004), a butirilcolinesterase purificada é capaz de degradar a grelina, e há uma correlação positiva entre a butirilcolinesterase e a desoctanoilização da grelina no soro humano.

O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) (SMITH *et al.*, 1997) e contém cinco éxons (TANAKA *et al.*, 2001). Este gene codifica a preprogreлина, um peptídeo precursor da grelina composto por 117 aminoácidos. Este peptídeo, após sofrer clivagem, formará a progreлина de 94 aminoácidos. A partir de um processamento pós-traducional na progreлина, são formados dois peptídeos: a grelina (28 aa) e a obestatina (23 aa), esta última com ação fisiológica oposta à da grelina (GUALILLO *et al.*, 2006).

Em humanos, três polimorfismos identificados no gene da grelina (*GHRL*) (Figura 3) têm sido estudados em relação à obesidade. Ukkola *et al.* (2001) encontraram a mutação *Arg51Gln* (*A51G*) apenas em mulheres obesas, mas não em seus controles. Essa mutação, que gera alteração no aminoácido 51 da sequência da preprogreлина, que corresponde ao último aminoácido da grelina madura, pode alterar o sítio de clivagem de endoproteases e o comprimento da grelina madura. A segunda mutação, *G274A*, não causa modificação na sequência de aminoácidos, pois está localizada em região intrônica entre os exons 1 e 2. Foi observada apenas em dois indivíduos obesos. Esses autores registraram também a mutação *Leu72Met* (*L72M*), codificadora de aminoácido que se encontra fora da região que forma a grelina madura, e sua função e significado permanecem incertos, uma vez que há dados mostrando que o portador dessa variante tende a se tornar obeso mais cedo do que os homozigotos para o tipo selvagem *72L*, sugerindo que o alelo *72M* pode afetar a atividade da grelina.

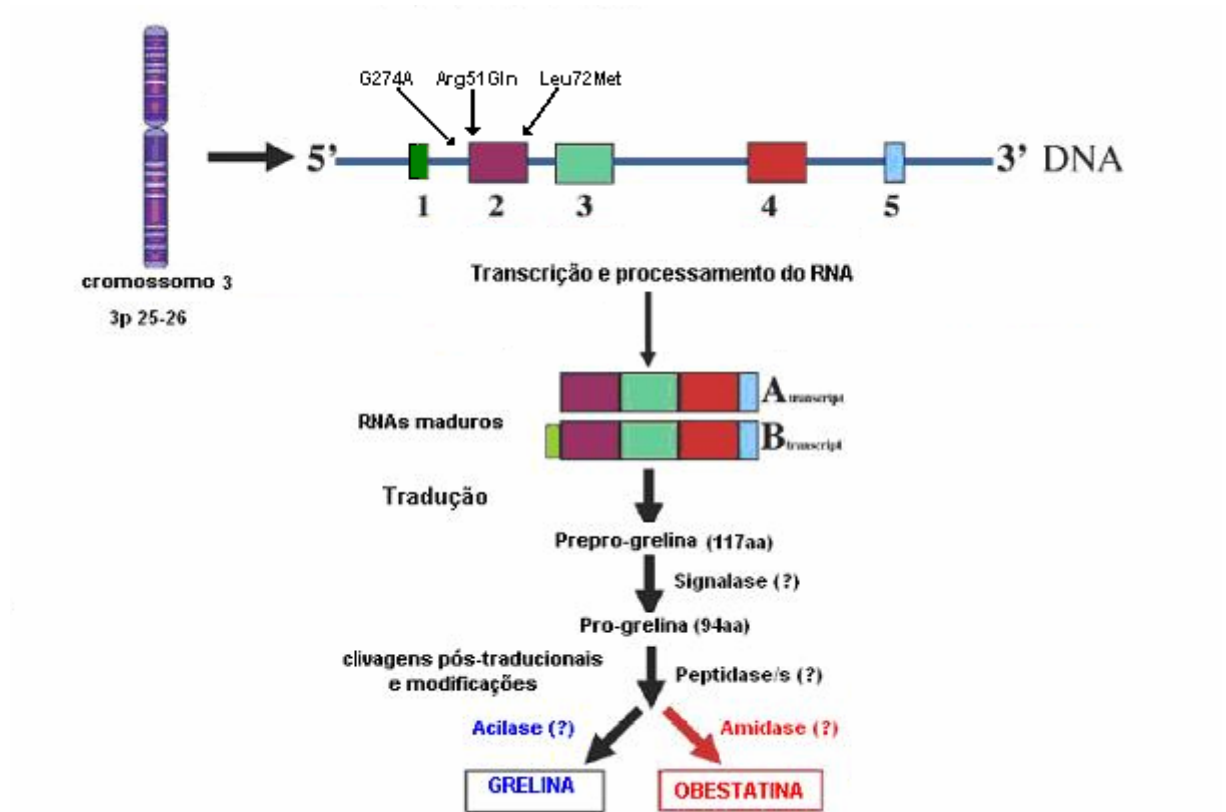


FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTANDO OS SÍTIOS DE MUTAÇÃO DO GENE DA GRELINA, PROCESSOS DE TRANSCRIÇÃO, TRADUÇÃO E PÓS TRADUÇÃO QUE VÃO FORMAR A GRELINA E A OBESTATINA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil eletroforético e as proporções relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase presentes no plasma de homens e mulheres obesos e não obesos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar a intensidade relativa, presença e ausência das bandas G1, G1-ALB, G2 e G4 da BChE em plasmas de 145 homens obesos e seus 133 controles e de 56 mulheres obesas e seus 56 controles.
2. Comparar obesos e controles quanto à frequência e média das intensidades relativas das bandas acima mencionadas.
3. Verificar os coeficientes de correlação entre as bandas da BChE.
4. Verificar os coeficientes de correlação dessas bandas da BChE com idade, índice de massa corporal, atividade da BChE, variantes dos exons 1 e 4 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase e variantes do gene *GHRL* da grelina.
5. Avaliar se existe associação das intensidades relativas das bandas da BChE com a obesidade e com as demais variáveis estudadas.

4 JUSTIFICATIVA

Dados sobre presença e ausência das formas moleculares da BChE em gel de poliacrilamida, suas intensidades relativas e suas relações com a obesidade foram obtidos apenas no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da UFPR, em amostra quase que exclusivamente do sexo feminino. Foi detectado falta do complexo G1-ALB da butirilcolinesterase e menor atividade desse complexo em obesos, quando comparados aos não obesos.

Os obesos que não apresentaram o complexo G1-ALB mostraram valores médios significativamente maiores da razão cintura/quadril (RCQ) e de colesterol total (CT), podendo a ausência desse complexo ser interpretada como indicativa de maior risco de doença arterial coronariana (ALCÂNTARA *et al.*, 2000b).

O trabalho atual dá continuidade aos trabalhos já realizados no Laboratório de Polimorfismo e Ligação, investigando, além de G1-ALB, outras formas moleculares da BChE em amostra de ambos os sexos.

Diante da preocupação crescente com a obesidade, é pertinente que as pesquisas acerca da fisiologia dessa doença se intensifiquem, como seus possíveis sinais indicativos, suas complicações e sua relação com outras doenças. Tendo em vista a associação da BChE com o metabolismo de lípidos e a diversas variáveis relacionadas com a obesidade, a análise das formas moleculares dessa enzima poderá futuramente servir de instrumento para uma melhor avaliação da gravidade dessa doença.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

A amostra do sexo masculino se refere a doadores de sangue, 145 obesos e 133 não obesos, retirada de uma amostra total de 3006 pessoas, das quais 2358 eram homens com informação sobre IMC e idade. A amostra do sexo feminino é formada por 56 mulheres obesas e 56 não obesas, de uma amostra total de 602 doadoras de sangue.

No caso da amostra masculina, são todos euro-brasileiros pareados por idade e de fenótipo CHE2 C5-. Os 145 obesos ($IMC \geq 30$), apresentaram média de idade de $36,44 \pm 9,5$ (de 18 a 59 anos), e os 133 controles ($20 \leq IMC < 25$) média de $36,44 \pm 9,3$ (de 18 a 60 anos). Na amostra de obesos estão incluídos todos aqueles da amostra total que apresentaram obesidade grave e mórbida ($IMC \geq 35$). A média do IMC em obesos é $33,86 \pm 3,03$ e, em controles, é $23,17 \pm 1,25$. Essa amostra foi utilizada por Furtado (2005), que a fenotipou para o loco *CHE2* e genotipou para variações nos exons 1 e 4 do gene *BCHE*, e por Dantas (2008), que a genotipou para o gene *GHRL* da grelina em relação a *L72M*.

A amostra de mulheres também é constituída apenas de euro-brasileiras, pareadas por idade, com idade média de $39,04 \pm 9,95$ (de 23 a 58 anos), no grupo de 56 obesas, e de $38,91 \pm 9,71$ (de 23 a 58 anos) nas 56 mulheres controles. A média do índice de massa corporal em obesas é $33,43 \pm 2,70$, e em controles é $22,34 \pm 1,27$.

Ambas as amostras pertencem ao banco do Laboratório de Polimorfismo e Ligação da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Elas foram coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), no período de 1995 a 1998, permanecendo conservadas a $-20^{\circ}C$ em freezer.

O estudo desses doadores de sangue, no que se refere a índice de massa corporal e variações da butirilcolinesterase, foi aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP; registro 2063).

5.2 METODOLOGIA

Esse trabalho dá seguimento à pesquisa anterior (CIPRIANI *et al.*, 1999; ALCÂNTARA *et al.*, 1999; 2000b; 2001a) e determinará parâmetros já avaliados, utilizando técnicas mais apropriadas, bem como irá acrescentar informações a respeito das variações dos exons 1 e 4 do gene *BCHE* e da variação *L72M* do gene *GHRL* da grelina.

5.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção das bandas G4, G2, G1-ALB e G1.

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo protocolo semelhante ao de Sambrook *et al.* (1989), com dois gradientes de densidade, padronizada em nosso laboratório. A preparação dos géis foi baseada em Alcântara (2000a), com modificações. Essas modificações consistiram na concentração do gel de separação, que inicialmente era de 11 %, e no tempo de corrida, que era de 20h.

No presente estudo, cada placa apresentou duas concentrações de gel de poliacrilamida: gel de alinhamento (5%) com 1 cm de comprimento e gel de separação (7%) com 13 cm de comprimento (Figura 4). A solução estoque de poliacrilamida (30%) utilizada continha 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida e água destilada em quantidade suficiente para completar 100 ml. Os reagentes utilizados para o preparo dos géis são mostrados na Tabela 3. As amostras aplicadas continham 7 µL de corante azul de bromofenol e 5 µL de plasma.

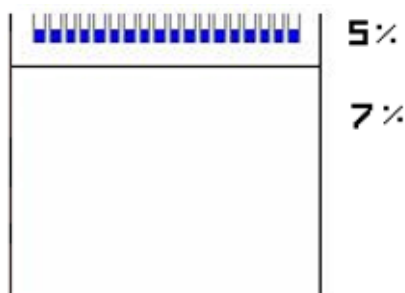


FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO GEL DE POLIACRILAMIDA COM 2 GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO.

A placa de gel, após permanecer em repouso durante a noite, foi submetida a uma pré-corrida de 30 minutos, sem a aplicação das amostras. Após a aplicação foi realizada a corrida eletroforética por 8 horas, a uma corrente elétrica de 100V. O tampão de corrida utilizado na cuba foi TBE 1X.

TABELA 3 - REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DAS DUAS CONCENTRAÇÕES DO GEL PARA ELETROFORESE

Reagentes	Concentrações do gel	
	5%	7%
	mL	mL
Poliacrilamida 29:1	1,7	5,8
Água Destilada	6,2	14,0
TBE 5X	2,0	5,0
Persulfato de amônia 10%	0,1	0,25
TEMED	0,01	0,025

Foram feitas várias eletroforeses em gel de poliacrilamida até que se conseguisse padronizar essa metodologia, de modo a obter distinta visualização das bandas. Foram tentadas diferentes condições quanto ao volume de plasma, quanto ao gel (concentração, tampão e comprimento), ao tempo de corrida e à voltagem.

5.2.2 Coloração do gel

Após a corrida, o gel foi imerso em solução de coloração e incubado a 37 °C na estufa, por 30 a 40 minutos. A solução de coloração era os reagentes relacionados na Tabela 4.

TABELA 4 - REAGENTES QUE COMPÕEM A SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO DO GEL PARA DETECÇÃO DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE

Fast Red TR	150 mg
Tampão Fosfato pH 7,1	60 ml
Solução de acetato de α -naftila	2,1 ml

A butirilcolinesterase do plasma hidrolisa o acetato de α -naftila formando alfa-naftol e ácido acético. O α -naftol reage com o sal de Fast Red TR, produzindo um azo derivado de cor púrpura, que revela as bandas referentes às diversas formas moleculares da BChE no gel, como mostrado na Figura 5.

Ao término da coloração, o gel foi lavado três vezes com água destilada, e colocado entre duas folhas de transparência. Logo em seguida, foi feita uma cópia em *Scanner* e o registro arquivado em computador, para posterior análise pelo programa *KODAK1D Image Analysis Software*.

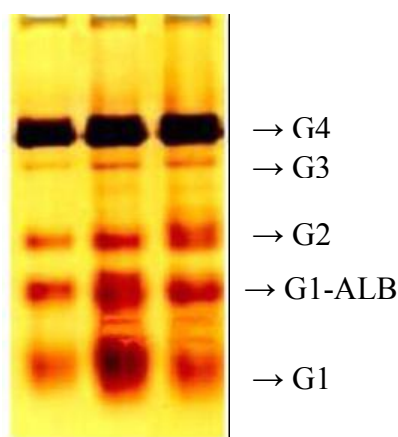


FIGURA 5 - GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO TRÊS AMOSTRAS APÓS COLORAÇÃO, COM CINCO BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE INDICADAS.

5.2.3 Análise de densitometria ótica pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software*

Para as análises de densitometria ótica foram selecionadas determinadas condições do programa.

Na caixa de diálogo de Ajuste de Linhas (*Adjust Lanes*; Figura 6), foi usado o modo automático, em que o próprio programa faz cada linha vertical correspondente a cada amostra de plasma (linhas azuis). Nessa mesma caixa de diálogo foram estabelecidos o número de amostras (18 no presente estudo), a sensibilidade 1 de uma escala de -3 (menos sensível) a +3 (mais sensível) e o tipo de linha reta. Na sensibilidade 1, o programa encontra o número de linhas mais próximo de 18. Quando o registro de linhas automático é inferior a 18, inserem-se as linhas que faltam.

Após esse procedimento, foi realizado um ajuste manual da melhor posição das linhas, a qual correspondia à região em que todas as bandas a serem analisadas estivessem bem definidas.

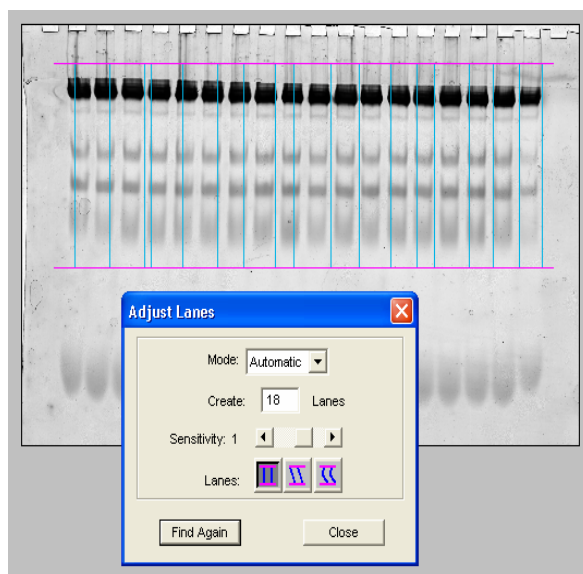


FIGURA 6 - IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA KODAK, MOSTRANDO A CAIXA DE DIÁLOGO *ADJUST LANES* E AO FUNDO O GEL A SER ANALISADO.

Em seguida, foram definidas as bandas na caixa de diálogo Ajuste de Bandas (*Adjust Bands*; Figura 7). No ajuste das bandas, foram escolhidas a sensibilidade de número 1 (escala de -3 a +3) e a largura de perfil de 20%, que vai determinar quanto da largura da banda será analisada.

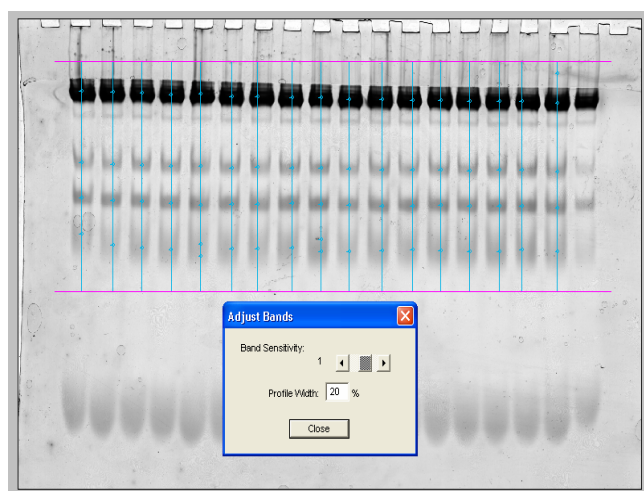


FIGURA 7 - IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA KODAK, MOSTRANDO A CAIXA DE DIÁLOGO *ADJUST BANDS* E AO FUNDO O GEL COM AS BANDAS SELECIONADAS.

Em seguida, num aumento maior (Figura 8), a região a ser analisada de cada banda foi delimitada. Foi a partir dessa delimitação (retângulos vermelhos) que o programa fez a análise da intensidade relativa de cada banda.

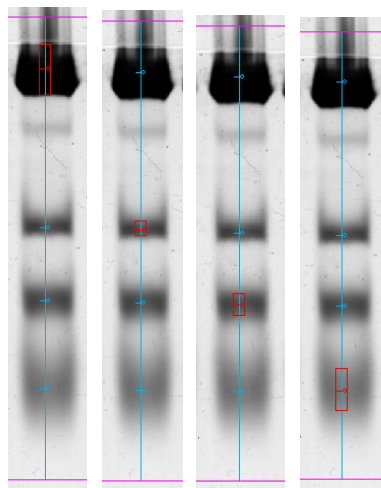


FIGURA 8 - IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA KODAK, MOSTRANDO A DELIMITAÇÃO DAS BANDAS PARA ANÁLISE.

Ficou estabelecido, durante a obtenção das intensidades relativas pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software*, que valor de intensidade $\leq 0,003$, em qualquer uma das bandas, seria considerado zero, ou seja, a respectiva banda seria considerada como ausente. Esse valor foi estipulado, uma vez que foi o valor mínimo registrado por Alcântara *et al.* (comunicação pessoal), em trabalho similar. Além disso, quando a banda tinha sido registrada com valor $\leq 0,003$, ela não era percebida visualmente, na maioria das vezes, e com o valor $> 0,003$ foi possível visualizá-la.

5.2.4 Coeficiente de variação da técnica

Coeficientes de variação da metodologia foram estimados com base nos dados de 18 aplicações da mesma amostra feminina não obesa, em dois géis. O coeficiente de variação (C.V.) foi calculado através da fórmula:

$$C.V = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

Os valores obtidos foram os seguintes: G4 (5,11% e 5,49%), G2 (8,28% e 10,60%), G1-ALB (6,25% e 8,71%) e G1 (6,64% e 9,25%).

5.2.5 Medida da atividade da BChE

A atividade total da BChE no plasma foi obtida do banco de dados do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, apenas para os homens, tendo sido avaliada por outros membros desse laboratório, seguindo a metodologia de Dietz *et al.* (1972), modificada por Evans e Wroe (1978). Essa metodologia se baseia na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A atividade foi calculada com o uso de espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25 °C. As médias de atividade foram $6,40 \pm 2,82$ KU/l em obesos e $4,55 \pm 1,29$ KU/l em controles.

O tampão fosfato 0,1 M pH 7,6, utilizado na reação, foi preparado pela mistura de duas soluções (a e b). A solução “a” continha 4,73 g de Na_2HPO_4 anidro (PM = 141,96) em 1000 ml de água destilada e a solução “b” continha 13,61 g de KH_2PO_4 anidro (PM = 136,09) em 1000 ml de água destilada. O DTNB (0,423 mM) foi dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167 g por 1000 ml. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) foi preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 ml de água destilada.

Os tubos contendo 2,2 ml de tampão-DTNB, e 0,25 ml de soro (diluído 1:100 em água destilada), foram mantidos por três minutos em banho-maria a 25 °C. Após os três minutos, foram adicionados 0,05 ml de substrato e iniciada a leitura. A primeira leitura, chamada A_0 , deve ser efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro. As leituras A_1 , A_2 e A_3 são efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A_0 . Após as quatro leituras, foi calculado o Δ/minuto (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/l), Δ/minuto é multiplicado pelo fator 73,53 e por 1.000.

5.2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Statistica for Windows* (StatSoft, Inc., versão 5.5, 2000;).

As variáveis analisadas foram as seguintes: intensidade relativa das bandas G4, G2, G1-ALB e G1 da BChE, IMC, idade, atividade da BChE, exons 1 e 4 do gene *BCHE*, sítio do gene *GHRL* (grelina) codificador do aminoácido 72 e obesidade.

Para as variáveis exons 1 e 4 do gene *BCHE*, 72 do gene *GHRL* e obesidade foram atribuídos valores como mostrado a seguir. Os dados de genótipos foram obtidos do banco de dados do Laboratório de Polimorfismos e Ligação.

- a) Exon 1 do gene *BCHE* : homozigoto selvagem -116GG = 1, -116GA = 2, -116AA = 3.
- b) Exon 4 do gene *BCHE* : homozigoto selvagem 539AA = 1, 539AT = 2 e 539TT = 3.
- c) Aminoácido 72 codificado pelo gene *GHRL*: homozigoto selvagem 72LL = 1, 72LM + 72MM = 2.
- d) Obesidade: não obesos = 1, obesos = 2.

Na análise da amostra feminina, as variáveis disponíveis para estudo foram as intensidades relativas de cada banda, o IMC e a idade.

Foram realizadas análises descritivas, obtendo-se média, erro padrão, desvio padrão, máximo e mínimo das variáveis estudadas. Utilizaram-se os testes t e F para comparar, respectivamente, médias e variâncias entre os grupos de obesos e de não obesos. Quando necessário, foi usado o valor do teste-t que considera as variâncias em separado, no caso dessas serem significativamente diferentes. Utilizou-se ainda o teste exato de Fisher bicaudal para comparar as frequências de obesos e controles sem detecção de bandas da BChE. Foram feitos cálculos de correlação simples entre as bandas e entre cada uma delas e as variáveis estudadas.

O programa Microsoft Excel foi usado para fazer os gráficos que mostram a distribuição de frequência dos homens obesos e controles, de acordo com a intensidade relativa de cada banda estudada.

Com a amostra de homens, foram realizadas oito análises de regressão múltipla escalonada (quatro em controles e quatro em obesos), tendo como variáveis dependentes as intensidades relativas de cada banda estudada. Nessas análises, as

variáveis independentes foram as seguintes: idade, IMC, atividade da BChE, exons 1 e 4 do gene *BCHE* e aminoácido 72 codificado pelo gene *GHRL*. Também foram realizadas 4 análises de regressão múltipla escalonada com a amostra total de obesos mais controles, considerando-se as intensidades relativas das bandas como variáveis dependentes e as mesmas variáveis independentes acima citadas, excluindo-se IMC e adicionando-se a variável obesidade.

Com a amostra total de mulheres (obesas + controles), foram realizadas quatro análises de regressão múltipla escalonada, considerando-se intensidade relativa de cada banda como variável dependente e as seguintes variáveis independentes: idade e obesidade.

Nas análises de regressão múltipla, o número total de indivíduos dos grupos estudados sofreu alterações, devido à falta de informações sobre algumas variáveis para alguns indivíduos.

6 RESULTADOS

Os dados referentes à amostra de homens serão apresentados em seguida e, ao término desses, serão registrados os dados obtidos a partir da amostra de mulheres.

A metodologia, empregada para determinar presença ou ausência de bandas, considerou ausência sempre que o valor de intensidade relativa obtido pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software* foi $\leq 0,003$.

6.1 ANÁLISE DAS BANDAS G1, G1-ALB, G2 E G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM HOMENS

Na Tabela 5, é apresentada a distribuição das freqüências dos indivíduos obesos e controles que mostraram ausência de alguma banda e os respectivos valores de p , obtidos pelo teste exato de Fisher bi-caudal, quando são comparados os grupos de obesos e de controles. Não houve nenhuma amostra sem a banda G4. Esses grupos diferem significativamente, sendo que a ausência de qualquer dessas três bandas foi sempre mais elevada no grupo controle.

TABELA 5 - FREQÜÊNCIAS DE OBESOS E CONTROLES NOS QUAIS NÃO FORAM DETECTADAS UMA OU MAIS DAS BANDAS G1, G1-ALB E G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE.

Amostras	Ausência de banda ^a					
	G1		G1-ALB		G2	
	N	%	N	%	N	%
Obesos (N = 145)	03	2,07	08	5,52	04	2,76
Controles (N = 133)	21	15,79	32	24,06	12	9,02
p	<0,0001		<0,0001		<0,05	

^a $\leq 0,003$ de intensidade relativa

As médias (\pm DP) das intensidades relativas das quatro bandas estudadas em obesos e controles são apresentadas na Tabela 6, que também mostra a comparação das médias (teste t) e das variâncias (teste F). As médias das

intensidades relativas das bandas são maiores em obesos, no caso de G1 e G1-ALB, e menores no caso de G4, quando comparadas com as dos controles. A variância da distribuição de G4 é maior em não obesos, enquanto a de G2 é maior em obesos.

TABELA 6 - MÉDIAS (M) \pm DESVIOS PADRÕES (DP) DAS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E CONTROLES COM RESULTADOS DE TESTES t E F E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE p .

	Obesos		Não Obesos		t(p)	F (p)
	N	M \pm DP	N	M \pm DP		
G4	145	0,692 \pm 0,131	133	0,768 \pm 0,156	4,410 (<0,0001)	1,411 (<0,05)
G2	145	0,039 \pm 0,031	133	0,033 \pm 0,026	1,590 (>0,10)	1,409 (<0,05)
G1-ALB	145	0,081 \pm 0,058	133	0,065 \pm 0,064	2,231 (<0,05)	1,253 (>0,15)
G1	145	0,188 \pm 0,105	133	0,133 \pm 0,107	4,311 (<0,0001)	1,054 (>0,75)

As Tabelas 7, 8, 9 e 10 e as Figuras de 9 a 12 mostram as distribuições de frequência de obesos e controles, de acordo com a intensidade relativa das bandas G4, G2, G1-ALB e G1, respectivamente.

Os valores máximos de intensidade relativa da banda G4 foram 0,99 e 1,0 e os mínimos, 0,29 e 0,31 em obesos e controles, respectivamente. Já para a banda G2, os máximos foram 0,16 em obesos e 0,12 em controles e os mínimos 0 em ambos os grupos. Para G1-ALB, os máximos foram 0,33 e 0,32 em obesos e controles, respectivamente, e os mínimos foram 0 para ambos. E para a banda G1, os valores máximos foram 0,44 para obesos e 0,49 para controles, e o mínimo 0 para ambos os grupos.

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS

Intensidade relativa de G4	Obesos		Não Obesos	
	N	%	N	%
$0,2 < x \leq 0,4$	3	2,07	2	1,50
$0,4 < x \leq 0,6$	33	22,76	17	12,78
$0,6 < x \leq 0,8$	80	55,17	56	42,11
$0,8 < x \leq 1,0$	29	20,00	58	43,61
Total	145	100	133	100

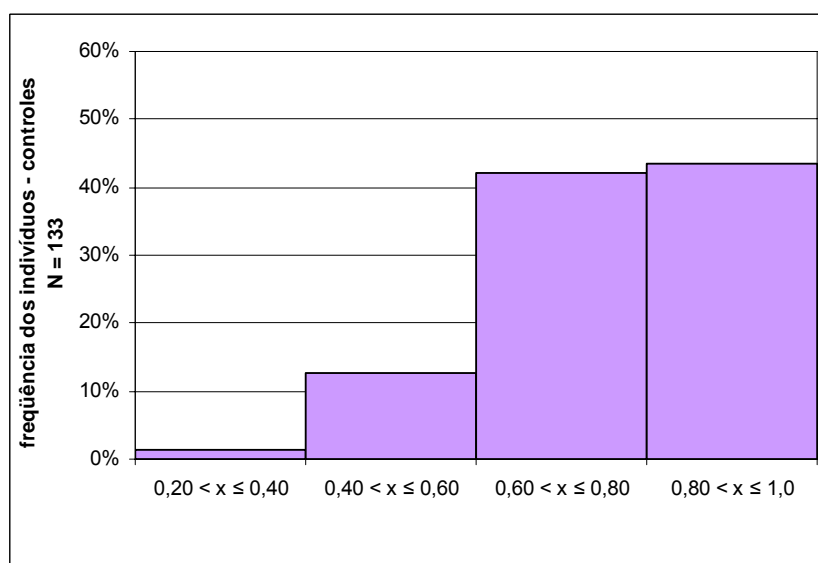
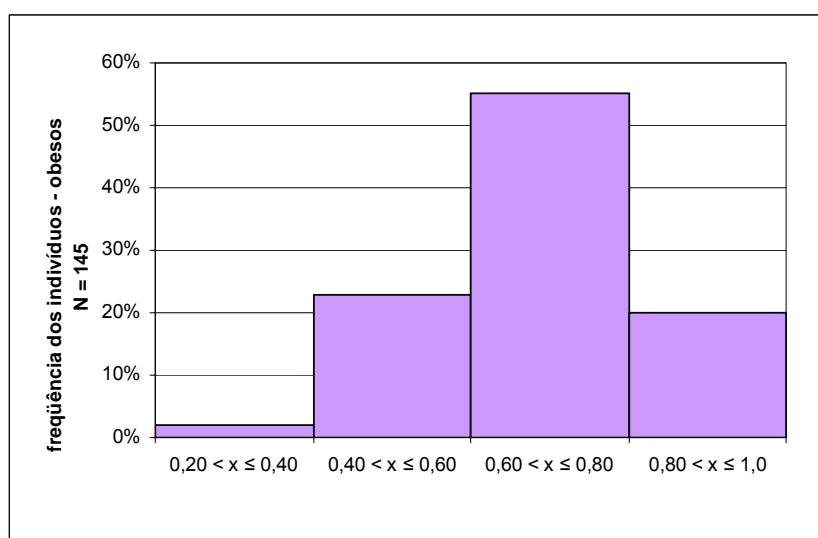


FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4.

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS

Intensidade relativa de G2	Obesos		Não Obesos	
	N	%	N	%
$x = 0,0$	4	2,76	12	9,02
$0,0 < x \leq 0,05$	105	72,41	93	69,93
$0,05 < x \leq 0,1$	29	20,00	26	19,55
$0,1 < x \leq 0,15$	6	4,14	2	1,50
$0,15 < x \leq 0,2$	1	0,69	0	0,00
Total	145	100	133	100

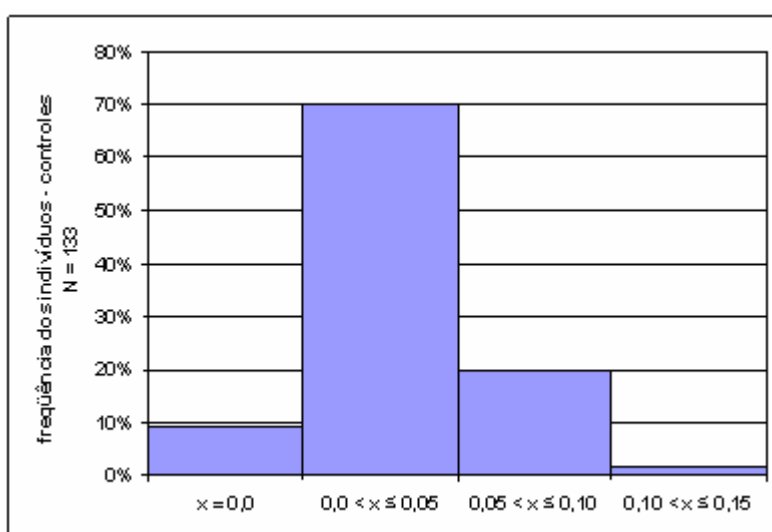
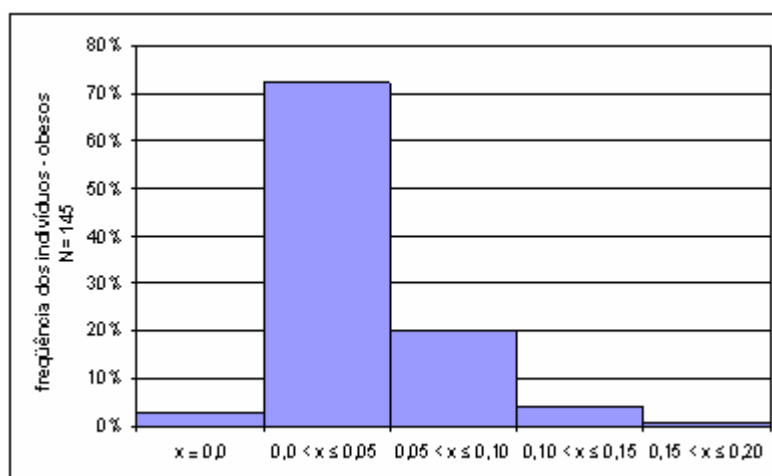


FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-ALB DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS

Intensidade relativa de G1-ALB	Obesos		Não Obesos	
	N	%	N	%
$x = 0,0$	8	5,52	32	24,06
$0,0 < x \leq 0,1$	87	60,00	65	48,87
$0,1 < x \leq 0,2$	47	32,41	33	24,81
$0,2 < x \leq 0,3$	2	1,38	2	1,51
$0,3 < x \leq 0,4$	1	0,69	1	0,75
Total	145	100	133	100

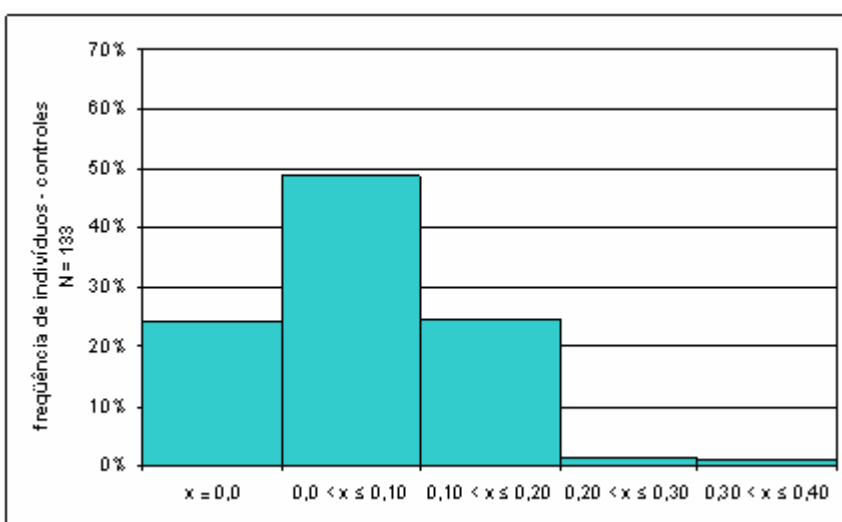
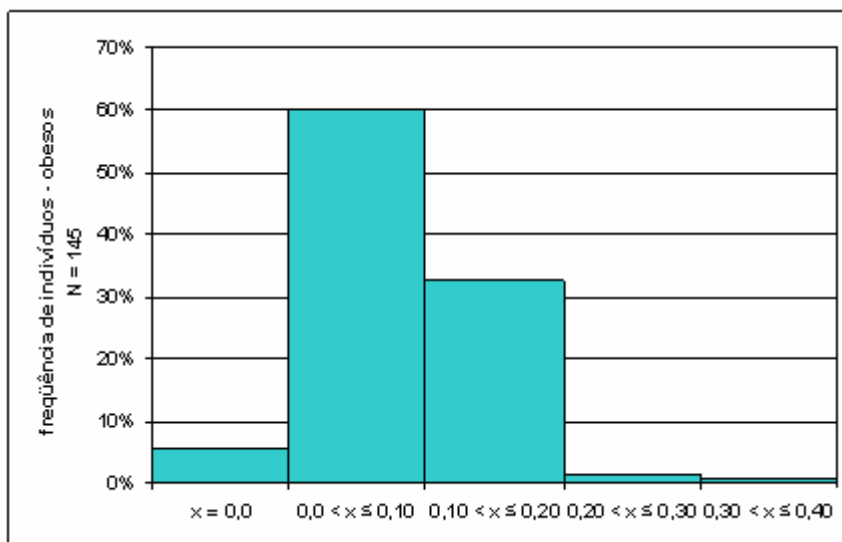


FIGURA 11 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-ALB.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESOS E NÃO OBESOS

Intensidade relativa de G1	Obesos		Não Obesos	
	N	%	N	%
$x = 0,0$	3	2,07	21	15,79
$0,0 < x \leq 0,1$	28	19,31	34	25,56
$0,1 < x \leq 0,2$	57	39,31	45	33,84
$0,2 < x \leq 0,3$	32	22,07	23	17,29
$0,3 < x \leq 0,4$	22	15,17	8	6,02
$0,4 < x \leq 0,5$	3	2,07	2	1,50
Total	145	100	133	100

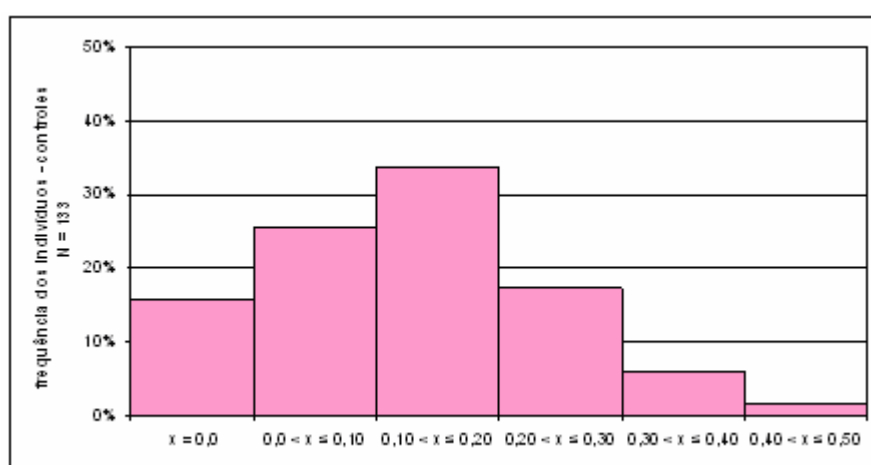
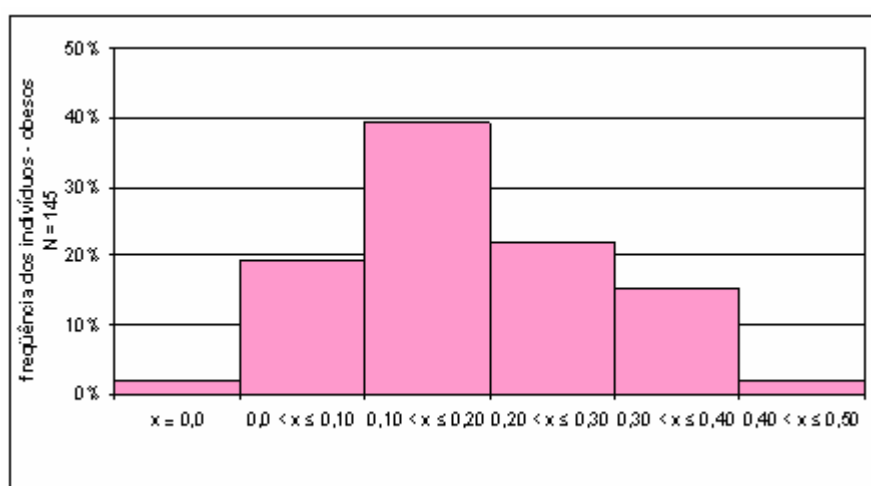


FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS OBESOS E CONTROLES EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1.

Para verificar o comportamento conjunto das bandas estudadas, tanto em obesos como em controles, foram feitas análises de correlação simples, cujos valores de r podem ser observados nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, NA AMOSTRA DE 145 OBESOS

Obesos			
	G2 (p)	G1-ALB (p)	G1 (p)
G4	-0,578 (< 0,001)	-0,573 (< 0,001)	-0,768(< 0,001)
G2		0,782 (< 0,001)	-0,002 (> 0,50)
G1-ALB			-0,064 (> 0,45)

TABELA 12 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, EM 133 CONTROLES

Não obesos			
	G2 (p)	G1-ALB (p)	G1 (p)
G4	-0,601 (< 0,001)	-0,748 (< 0,001)	-0,858(< 0,001)
G2		0,680 (< 0,001)	0,221 (< 0,05)
G1-ALB			0,320 (< 0,001)

Verificou-se que as correlações entre as bandas apresentam sentidos e magnitudes semelhantes nas duas amostras, com exceção de G1 X G1-ALB e de G2 X G1, que nos obesos não mostraram correlação e nos não obesos mostraram correlação positiva.

A seguir são mostrados os gráficos de correlação entre as bandas no grupo de obesos (Figuras 13 a 18) e, em seguida, no grupo de controles (Figuras 19 a 24).

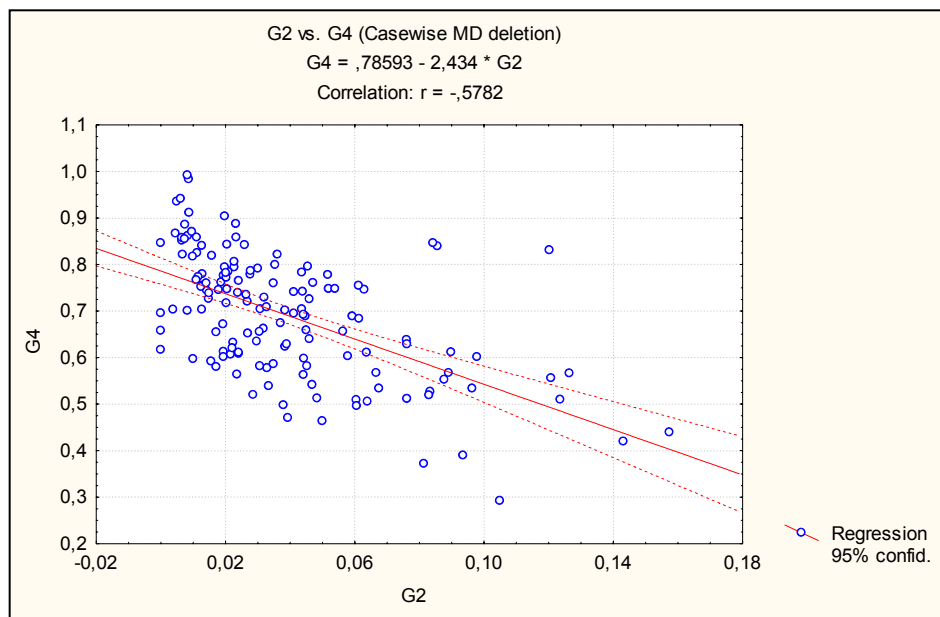


FIGURA 13 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($r = -,5782$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G2 NO GRUPO DOS OBESOS

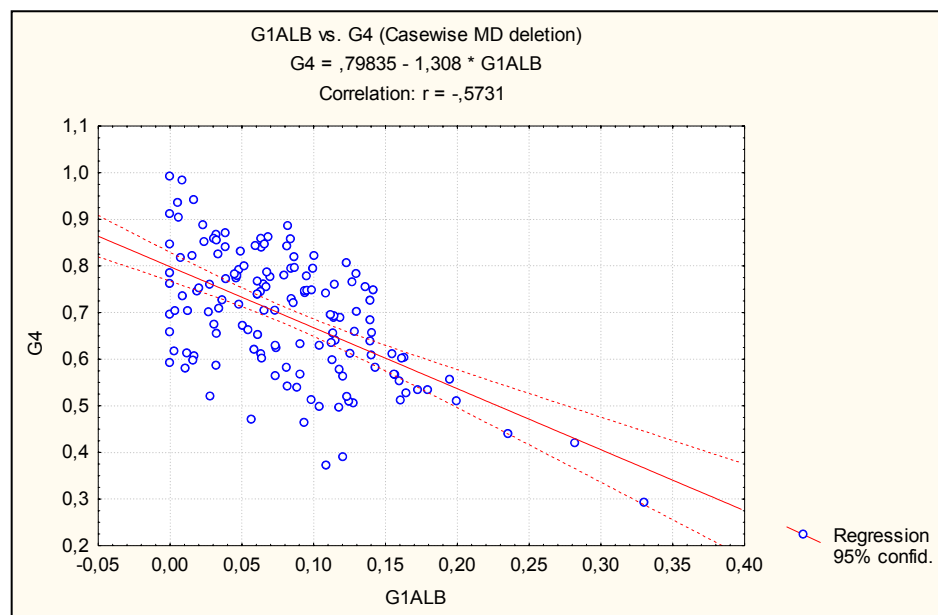


FIGURA 14 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($r = -,5731$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1-ALB NO GRUPO DOS OBESOS

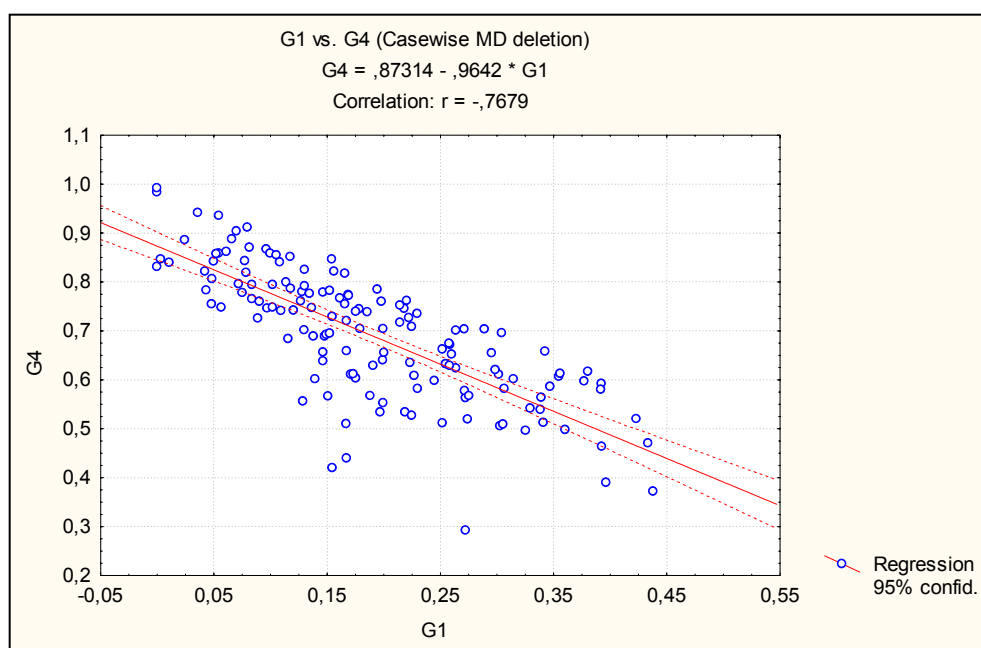


FIGURA 15 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($r = -,7679$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1 NO GRUPO DOS OBESOS

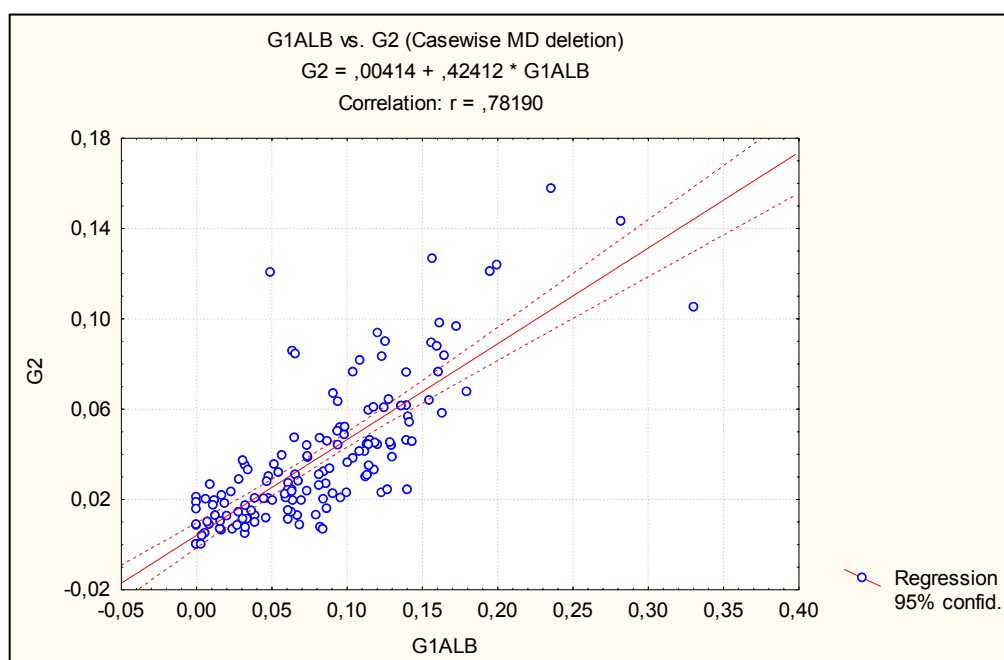


FIGURA 16 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($r = 0,7819$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1-ALB NO GRUPO DOS OBESOS

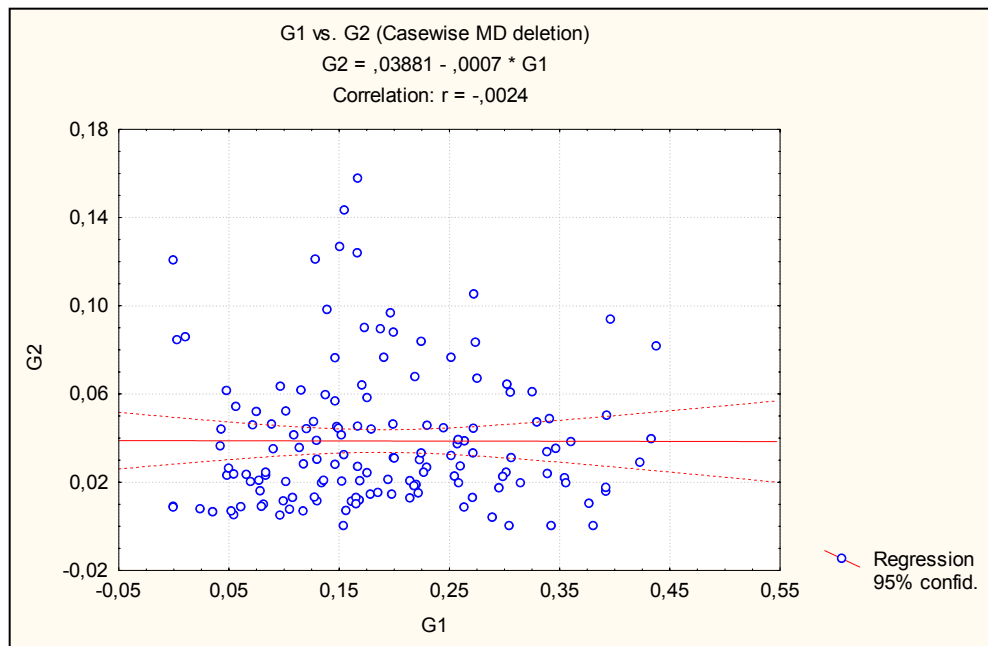


FIGURA 17 - GRÁFICO MOSTRANDO A FALTA DE CORRELAÇÃO ($r = -0,0024$; $p > 0,50$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1 NO GRUPO DOS OBESOS

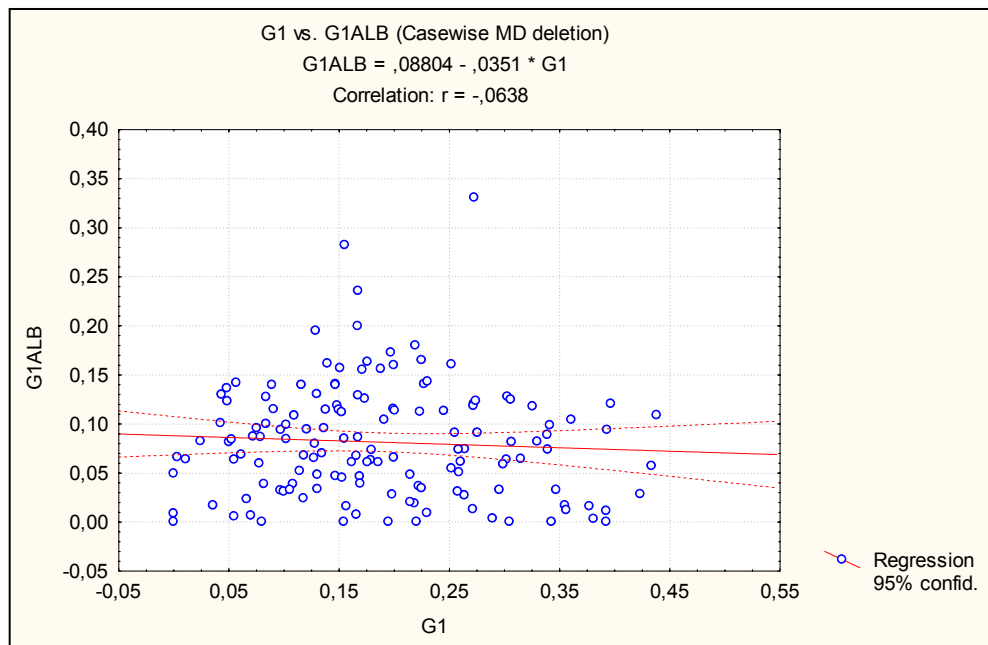


FIGURA 18 - GRÁFICO MOSTRANDO A FALTA DE CORRELAÇÃO ($r = -0,0638$; $p > 0,45$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G1-ALB E G1 NO GRUPO DOS OBESOS

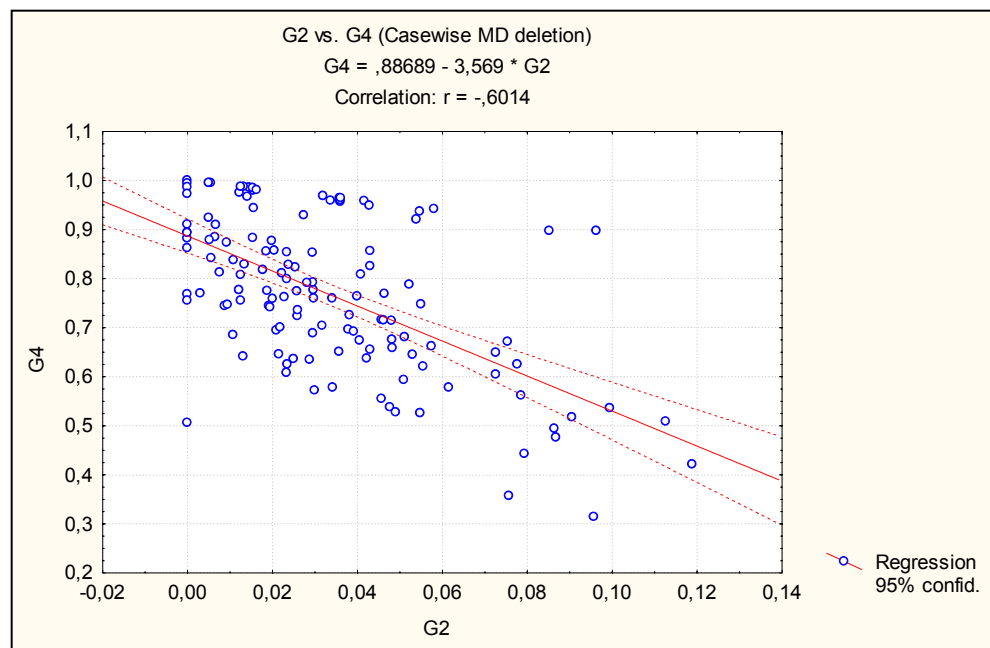


FIGURA 19 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($r = -0,6014$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G2 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS

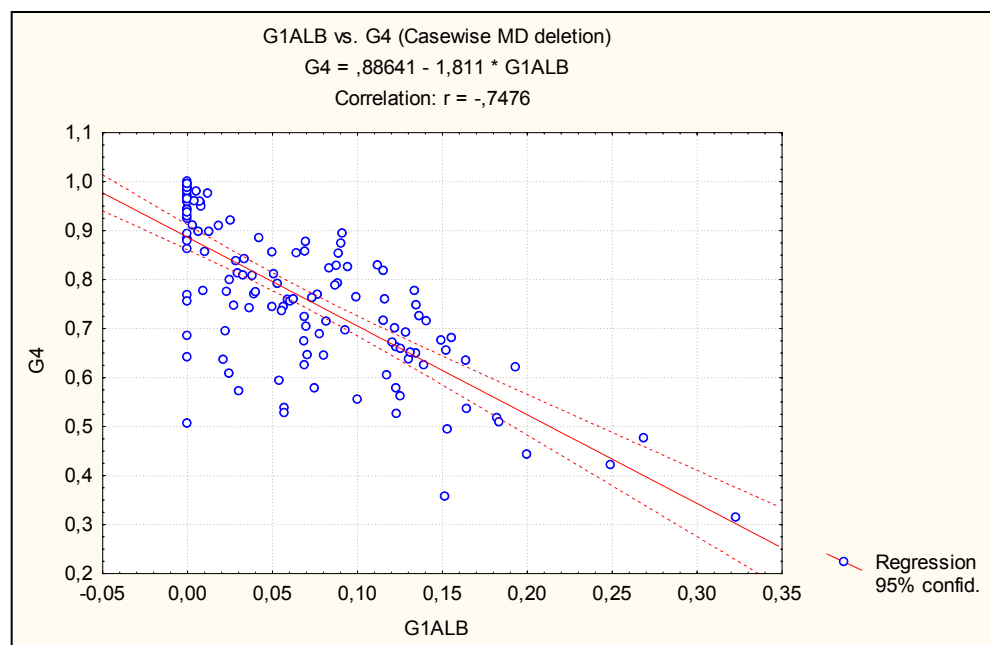


FIGURA 20 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($r = -0,7476$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1-ALB NO GRUPO DOS NÃO OBESOS

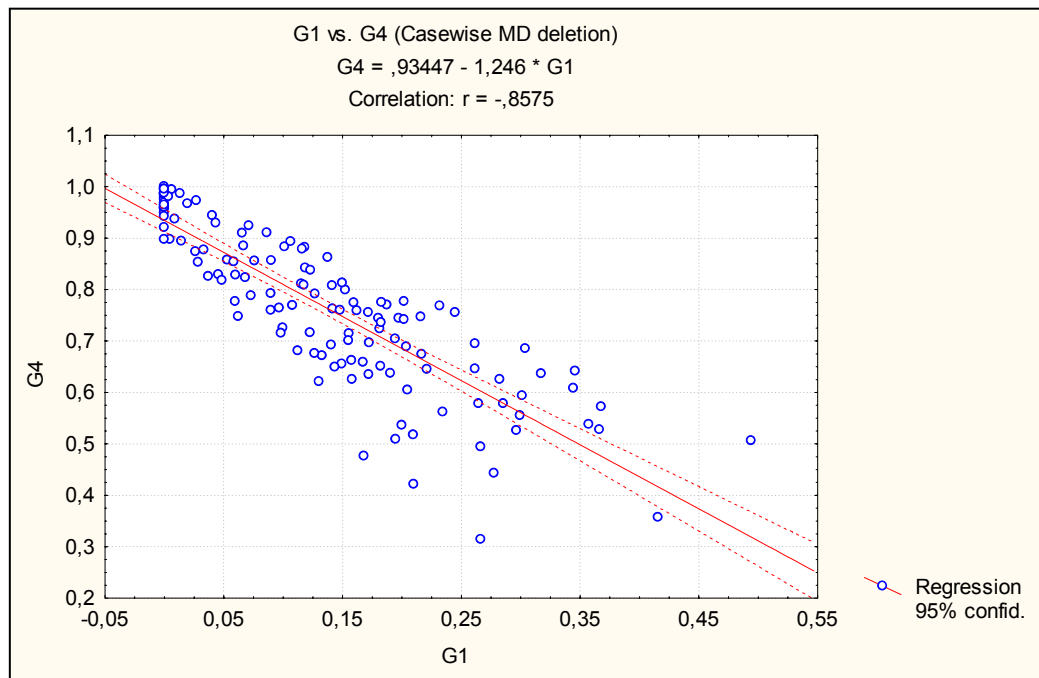


FIGURA 21 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO NEGATIVA ($r = -0,858$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4 E G1 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS

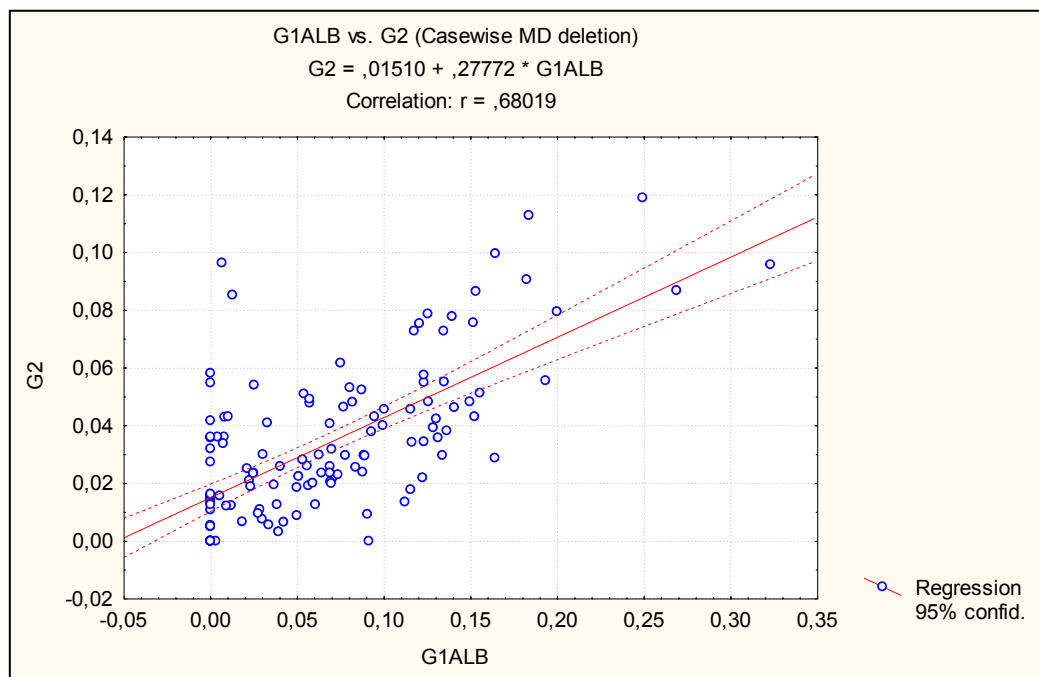


FIGURA 22 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($r = 0,6802$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1-ALB NO GRUPO DOS NÃO OBESOS.

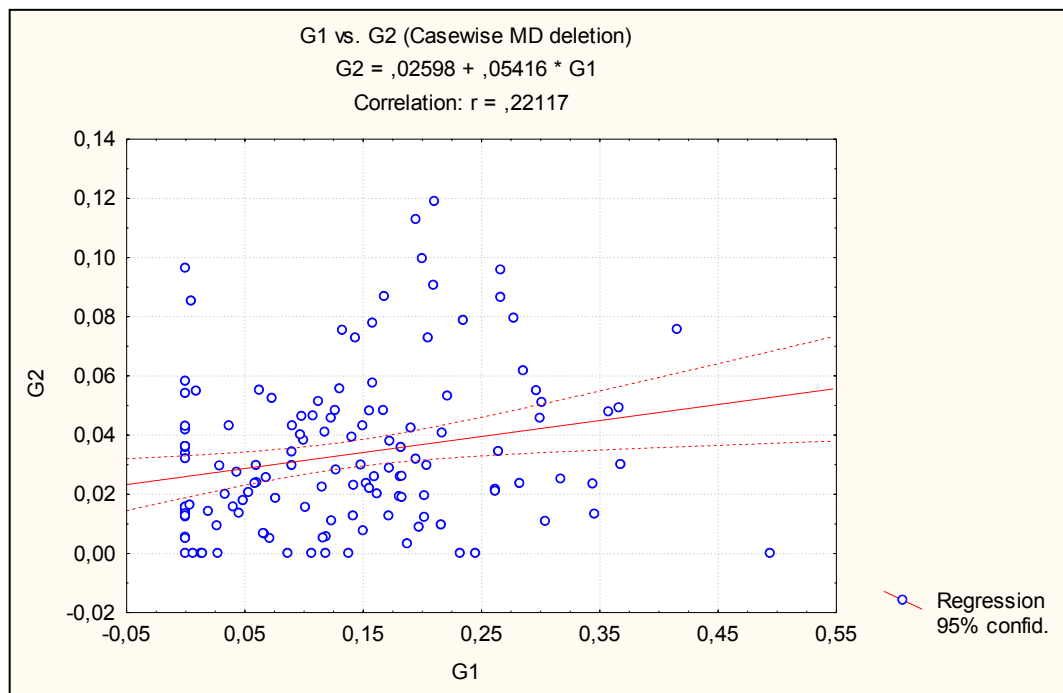


FIGURA 23 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($r = 0,2212$; $p < 0,05$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G2 E G1 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS

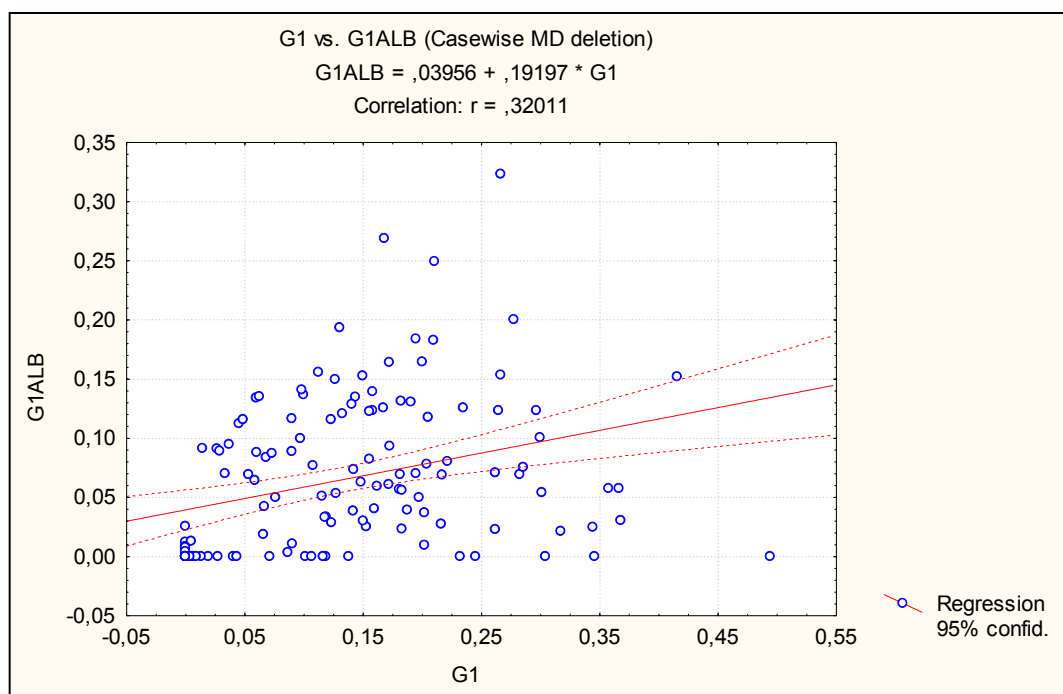


FIGURA 24 - GRÁFICO MOSTRANDO A CORRELAÇÃO POSITIVA ($r = 0,320$; $p < 0,001$) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G1-ALB E G1 NO GRUPO DOS NÃO OBESOS

Quando foram retirados da análise os indivíduos com intensidade relativa de valor zero, obteve-se uma alteração apenas na correlação entre G1 X G1-ALB dos controles, as quais possuíam uma correlação positiva ($r = 0,320$; $p < 0,001$), e deixaram de ter essa correlação ($r = 0,061$; $p > 0,55$).

6.1.1 Análises entre as intensidades relativas das bandas da butirilcolinesterase e as variáveis estudadas

Foram realizadas correlações entre as variáveis estudadas (idade, IMC, atividade da BChE, exon 1 e exon 4 do gene *BCHE* e gene *GHRL* da grelina) com as intensidades relativas das bandas da BChE (G4, G2, G1-ALB e G1). Em obesos, as correlações estatisticamente significativas foram entre a banda G4 e a atividade ($r = -0,24$ e $p < 0,01$), entre G4 e a variação do aminoácido 72 codificado pelo gene *GHRL* ($r = -0,20$ e $p < 0,05$, sendo que a intensidade relativa de G4 diminui quando se passa do genótipo *72LL* para *72LM+MM*), e entre a banda G1 e a atividade ($r = 0,197$ e $p < 0,05$). No grupo controle, houve correlação estatisticamente significativa apenas da banda G4 com a atividade ($r = -0,21$ e $p < 0,05$).

Foram realizadas quatro análises de regressão múltipla escalonada com os dados de cada um dos dois grupos estudados, tendo-se considerado como variáveis dependentes as atividades relativas de cada banda (G4, G2, G1-ALB e G1) da BChE, e incluindo-se as seguintes variáveis como independentes: idade, IMC, atividade da BChE, exons 1 e 4 do gene *BCHE* e aminoácido 72 codificado pelo gene *GHRL* da grelina. Em apenas duas das oito análises de regressão múltipla escalonada, foram obtidos modelos de regressão estatisticamente significativos.

Em obesos, foi observado coeficiente de regressão significativo da banda G4 com a atividade da BChE, num modelo de regressão econômico que, em seguida, também incluiu as variáveis grelina (aminoácido 72) e IMC, como exposto na Tabela 13. O coeficiente de regressão referente à grelina está próximo do nível de significância de 5%. Pelo resultado dessa tabela, pode-se verificar que à medida que a atividade da BChE aumenta, ocorre diminuição da intensidade relativa da banda G4 dessa enzima.

Em controles, foram observados coeficientes de regressão significativos da banda G4 com a atividade da BChE e com os exons 1 e 4 do gene *BCHE*, num

modelo de regressão econômico, que também incluiu o IMC (Tabela 14). Como no caso dos obesos, há correlação negativa entre a atividade da BChE e a intensidade relativa da banda G4. Neste modelo de regressão, os genótipos com a variante -116A do exon 1 do gene *BCHE* tendem a ter menor intensidade de G4 e a presença de 539T do exon 4 desse mesmo gene está associada com maior intensidade de G4, desde que se considerem as contribuições dadas pelas variáveis que entraram antes nesse modelo de regressão. Nesses 125 controles há 22 heterozigotos e um homozigoto para o alelo -116A e 35 heterozigotos e 7 homozigotos para o alelo 539T.

Foram realizadas também análises de regressão múltipla escalonada, sem separar os obesos dos controles. Considerou-se a intensidade relativa das bandas como variáveis dependentes e as independentes foram: idade, atividade da BChE, exons 1 e 4 do gene *BCHE*, aminoácido 72 codificado pelo gene *GHRL* da grelina e obesidade. A variável obesidade diferencia os grupos de obesos e controles com valores referenciais (controles = 1 e obesos = 2), a fim de comparar o comportamento da intensidade relativa das bandas da BChE na amostra conjunta, levando em conta a obesidade e demais variáveis. Dentre as quatro análises de regressão múltipla realizadas, foram obtidos modelos de regressão estatisticamente significativos apenas no caso das bandas G4 e G1.

No modelo econômico de regressão da banda G4, foi observado coeficiente de regressão significativo com a atividade da BChE e com obesidade. Os coeficientes de regressão quanto aos genes *GHRL* e *BCHE* (exon 4) apresentaram valores bem próximos do nível de significância de 5%. Esse modelo pode ser visto na Tabela 15.

No caso da banda G1, também foi observado coeficiente de regressão significativo com a atividade da BChE e com obesidade, num modelo econômico de regressão que também incluiu as variáveis gene *GHRL* (aminoácido 72) e exons 4 e 1 do gene *BCHE* (Tabela 16).

Na análise de regressão múltipla escalonada da banda G2 obteve-se resultado significativo apenas com a atividade da BChE, e nenhuma outra variável é incluída em seu modelo de regressão. O valor de correlação simples entre G2 e atividade da BChE é 0,154 ($p < 0,02$).

Resultado semelhante ocorreu na regressão múltipla escalonada, quando a banda G1-ALB é a variável dependente, apresentando coeficiente de regressão

significativo apenas com a atividade da BChE. Neste caso, o valor de r é 0,161 ($p < 0,02$).

TABELA 13 - RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTES À AMOSTRA DE 124 OBESOS, CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE

$Y \pm DP = 0,69 \pm 0,13$		$\text{Intercepto} \pm EP = 0,65 \pm 0,13$		
Variáveis independentes	Média \pm DP	$b \pm EP$	t	p
Atividade da BChE (KU/l)	$6,34 \pm 2,89$	$-0,0091 \pm 0,0040$	2,29	0,024
gene <i>GHRL</i> ^a	$1,12 \pm 0,33$	$-0,0642 \pm 0,0353$	1,82	0,071
IMC (Kg/m ²)	$32,79 \pm 2,87$	$0,0053 \pm 0,0039$	1,34	0,182
Análise de variância				
Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	F	r ²
Regressão	3	0,32	4,07	0,09
Resíduo	120	2,69	$p < 0,01$	
Total	123	3,01		

^a homozigoto selvagem 72LL = 1, 72LM + 72MM = 2. **negrito**: estatisticamente significativo

TABELA 14 - RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTES À AMOSTRA DE 125 NÃO OBESOS, CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE

$Y \pm DP = 0,77 \pm 0,16$		$\text{Intercepto} \pm EP = 1,30 \pm 0,26$		
Variáveis independentes	Média \pm DP	b \pm EP	t	p
Atividade da BChE (KU/l)	4,52 \pm 1,29	-0,025 \pm 0,011	2,29	0,024
Exon 1 do gene <i>BCHE</i> ^a	1,19 \pm 0,42	-0,097 \pm 0,039	2,49	0,014
Exon 4 do gene <i>BCHE</i> ^b	1,39 \pm 0,59	0,064 \pm 0,028	2,29	0,024
IMC (Kg/m ²)	23,11 \pm 1,25	-0,017 \pm 0,011	1,53	0,129
Análise de variância				
Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	F	r ²
Regressão	4	0,32	3,59	0,11
Resíduo	120	2,69	p < 0,01	
Total	124	3,02		

^a homozigoto selvagem -116GG = 1, -116GA = 2, -116AA = 3, ^b homozigoto selvagem 539AA = 1, 539AT = 2 e 539TT = 3.

negrito: estatisticamente significativo

TABELA 15 - RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTE À AMOSTRA TOTAL (N = 249), CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE

Y ± DP = 0,73 ± 0,15		Intercepto ± EP = 0,93 ± 0,05		
Variáveis independentes	Média ± DP	b ± EP	t	p
Atividade da BChE (KU/l)	5,43 ± 2,41	-0,012 ± 0,004	2,87	0,005
Obesidade ^a	1,50 ± 0,50	-0,051 ± 0,019	2,65	0,009
gene <i>GHRL</i> ^b	1,11 ± 0,32	-0,056 ± 0,029	1,96	0,051
Exon 4 do gene <i>BCHE</i> ^c	1,40 ± 0,59	0,031 ± 0,018	1,72	0,086
Exon 1 do gene <i>BCHE</i> ^d	1,19 ± 0,40	-0,037 ± 0,027	1,36	0,175
Análise de variância				
Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	F	r ²
Regressão	5	0,665	6,81	0,123
Resíduo	243	4,742	p < 0,0001	
Total	248	5,407		

^a controle = 1, obeso = 2, ^b homozigoto selvagem 72LL = 1, 72LM + 72MM = 2, ^c homozigoto selvagem 539AA = 1, 539AT = 2 e 539TT = 3

^d homozigoto selvagem -116GG = 1, -116GA = 2, -116AA = 3, **negrito**: estatisticamente significativo

TABELA 16 - RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTE À AMOSTRA TOTAL (N = 249), CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE

Y ± DP = 0,16 ± 0,11		Intercepto ± EP = 0,02 ± 0,04		
Variáveis independentes	Média ± DP	b ± EP	t	p
Atividade da BChE (KU/l)	5,43 ± 2,41	0,007 ± 0,003	2,44	0,016
Obesidade ^a	1,50 ± 0,50	0,038 ± 0,014	2,72	0,007
gene <i>GHRL</i> ^b	1,11 ± 0,32	0,038 ± 0,021	1,87	0,060
Exon 4 do gene <i>BCHE</i> ^c	1,40 ± 0,59	-0,020 ± 0,013	1,53	0,126
Exon 1 do gene <i>BCHE</i> ^d	1,19 ± 0,40	0,023 ± 0,020	1,17	0,242
Análise de variância				
Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	F	r ²
Regressão	5	0,30	5,91	0,108
Resíduo	243	2,45	p < 0,0001	
Total	248	2,75		

^a controle = 1, obeso = 2, ^b homozigoto selvagem 72LL = 1, 72LM + 72MM = 2, ^c homozigoto selvagem 539AA = 1, 539AT = 2 e 539TT = 3

^d homozigoto selvagem -116GG = 1, -116GA = 2, -116AA = 3, **negrito**: estatisticamente significativo

6.2 ANÁLISE DAS BANDAS G1, G1-ALB, G2 E G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM MULHERES

A análise de distribuição das frequências das mulheres obesas e controles que mostraram ausência de alguma banda pode ser vista na Tabela 17, bem como os respectivos valores de p , obtidos pelo teste exato de Fisher bi-caudal, quando são comparados os grupos de obesas e de controles. Não houve nenhuma amostra sem as bandas G4 e G1. Também não houve diferença significativa entre os grupos, quanto a ausência das bandas G1-ALB e G2 no entanto, foi observada uma tendência a ausência dessas bandas ser mais elevada no grupo controle.

TABELA 17 - FREQUÊNCIAS DE OBESAS E CONTROLES NOS QUAIS AS BANDAS G1-ALB E G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE NÃO FORAM DETECTADAS

Amostras	Ausência de banda			
	G1-ALB		G2	
	N	%	N	%
Obesas (N = 56)	05	8,93	05	8,93
Controles (N = 56)	09	16,07	10	17,86
P	< 0,30		< 0,20	

Na Tabela 18, a seguir, temos as médias (\pm DP) das intensidades relativas obtidas das quatro bandas estudadas em obesas e controles, e comparação das médias (teste t) e das variâncias (teste F) com seus respectivos valores de p . As médias das intensidades relativas das bandas são maiores em obesas, quando comparadas com as de controles, com exceção da banda G4, que é maior em controles.

TABELA 18 - MÉDIAS (M) \pm DESVIOS PADRÕES (DP) DAS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM GRUPOS DE OBESAS E CONTROLES COM RESULTADOS DE TESTES t E F E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE p

	Obesas		Não Obesas		t(p)	F (p)
	N	M \pm DP	N	M \pm DP		
G4	56	0,633 \pm 0,131	56	0,726 \pm 0,120	3,916 (<0,0002)	1,193 (>0,05)
G2	56	0,047 \pm 0,025	56	0,030 \pm 0,025	3,529 (<0,0007)	1,001 (>0,09)
G1-ALB	56	0,108 \pm 0,068	56	0,077 \pm 0,064	2,481 (<0,02)	1,103 (>0,70)
G1	56	0,213 \pm 0,116	56	0,168 \pm 0,088	2,315 (<0,025)	1,746 (<0,05)

As distribuições de freqüência de obesas e não obesas, de acordo com a intensidade relativa das bandas G4, G2, G1-ALB e G1, podem ser vistas nas Tabelas 19 a 22.

Os valores máximos de intensidade relativa da banda G4 foram 0,94 e 0,98 e os mínimos, 0,38 e 0,41 em obesas e controles, respectivamente. Já para a banda G2, os máximos foram 0,10 em obesas e 0,08 em controles e os mínimos 0 em ambos os grupos. Para G1-ALB, os máximos foram 0,24 e 0,20 em obesas e controles, respectivamente, e os mínimos foram 0 para ambos. Para a banda G1, os valores máximos foram 0,54 para obesas e 0,44 para controles, e os mínimos foram 0,2 para ambos os grupos.

TABELA 19 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESAS E NÃO OBESAS

Intensidade relativa de G4	Obesas		Não Obesas	
	N	%	N	%
0,2 < x \leq 0,4	0	0	1	1,79
0,4 < x \leq 0,6	9	16,07	24	42,86
0,6 < x \leq 0,8	30	53,57	23	41,07
0,8 < x \leq 1,0	17	30,36	8	14,28
Total	56	100	56	100

TABELA 20 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE, EM OBESAS E NÃO OBESAS

Intensidade relativa de G2	Obesas		Não Obesas	
	N	%	N	%
$-0,02 < x \leq 0,0$	5	8,93	10	17,86
$0,0 < x \leq 0,02$	5	8,93	15	26,78
$0,02 < x \leq 0,04$	14	25,00	10	17,86
$0,04 < x \leq 0,06$	14	25,00	13	23,21
$0,06 < x \leq 0,08$	13	23,21	8	14,29
$0,08 < x \leq 0,10$	5	8,93	0	0
Total	56	100	56	100

TABELA 21 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-ALB DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESAS E NÃO OBESAS

Intensidade relativa de G1-ALB	Obesas		Não Obesas	
	N	%	N	%
$-0,05 < x \leq 0,0$	5	8,93	9	16,07
$0,0 < x \leq 0,05$	9	16,07	14	25,00
$0,05 < x \leq 0,10$	9	16,07	11	19,64
$0,10 < x \leq 0,15$	18	32,14	11	19,64
$0,15 < x \leq 0,20$	11	19,64	10	17,86
$0,20 < x \leq 0,25$	4	7,15	1	1,79
Total	56	100	56	100

TABELA 22 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA FEMININA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM OBESAS E NÃO OBESAS

Intensidade relativa de G1	Obesas		Não Obesas	
	N	%	N	%
$0,0 < x \leq 0,1$	7	12,50	11	19,64
$0,1 < x \leq 0,2$	24	42,86	27	48,22
$0,2 < x \leq 0,3$	11	19,64	13	23,22
$0,3 < x \leq 0,4$	10	17,86	4	7,14
$0,4 < x \leq 0,5$	3	5,36	1	1,78
$0,5 < x \leq 0,6$	1	1,78	0	0
Total	56	100	56	100

Nas Tabelas 23 e 24 pode-se verificar o comportamento conjunto das bandas estudadas, em ambos os grupos, através das análises de correlação simples.

TABELA 23 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, NA AMOSTRA DE 56 OBESAS

	Obesas		
	G2 (p)	G1-ALB (p)	G1 (p)
G4	-0,514 (< 0,001)	-0,452 (< 0,001)	-0,752 (< 0,001)
G2		0,746 (< 0,001)	-0,073 (> 0,50)
G1-ALB			-0,235 (> 0,05)

TABELA 24 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE, EM 56 CONTROLES

	Não obesas		
	G2 (p)	G1-ALB (p)	G1 (p)
G4	-0,629 (< 0,001)	-0,669 (< 0,001)	-0,692 (< 0,001)
G2		0,835 (< 0,001)	-0,042 (> 0,50)
G1-ALB			-0,061 (> 0,50)

Verificou-se que, tanto nas mulheres obesas como nas controles, as correlações entre as intensidades das bandas da BChE apresentam sentidos e

magnitudes semelhantes. Não foram feitos gráficos de correlação para a amostra feminina, pois os dados significativos são semelhantes em ambos os sexos, em sentido e valores de r .

Foram realizadas ainda correlações entre idade e IMC com as intensidades relativas das bandas da BChE (G4, G2, G1-ALB e G1). Apenas a banda G1, no grupo controle, apresentou correlação com a idade ($r = 0,396$; $p < 0,05$).

Nessa amostra também foram realizadas análises de regressão múltipla escalonada, considerando-se a amostra total (obesas e controles juntos). As variáveis dependentes foram as intensidades relativas das bandas G4, G2, G1-ALB e G1, e as independentes foram: idade e obesidade. Apenas no caso da regressão que considerou a banda G1 foram verificadas correlações múltiplas significativas (Tabela 25), sendo que a intensidade relativa de G1 aumenta com obesidade e com a idade.

Para os casos em que houve correlação estatisticamente significativa, apenas entre uma banda e uma variável única, foram observadas as seguintes correlações simples: a banda G4 está negativamente correlacionada com obesidade ($r = - 0,350$ e $p < 0,001$); a banda G2 apresentou correlação positiva com obesidade ($r = 0,319$ e $p < 0,001$); G1-ALB também está correlacionada positivamente com obesidade ($r = 0,230$ e $p < 0,02$).

TABELA 25 - RESULTADOS DE ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, REFERENTE À AMOSTRA FEMININA, CONSIDERANDO-SE A INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 COMO VARIÁVEL DEPENDENTE

Y ± DP = 0,19 ± 0,11		Intercepto ± EP = 0,04 ± 0,05		
Variáveis independentes	Média ± DP	b ± EP	t	p
Obesidade ^a	1,5 ± 0,50	0,045 ± 0,019	2,34	0,021
Idade	38,97 ± 9,79	0,038 ± 0,001	2,17	0,032
Análise de variância				
Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	F	r ²
Regressão	2	0,10	5,12	0,086
Resíduo	109	1,12	p < 0,01	
Total	111	1,22		

^a controle = 1, obeso = 2, **negrito**: estatisticamente significativo

7 DISCUSSÃO

Na discussão, em um primeiro momento, serão feitas considerações sobre a detecção ou não detecção das bandas estudadas da BChE, e sobre a metodologia empregada. Posteriormente, serão comentadas as correlações feitas entre a intensidade relativa dessas bandas e também correlações delas com as variáveis estudadas, expondo ainda os resultados significativos obtidos nas regressões múltiplas realizadas nos grupos controles e obesos. Por último, será feita uma análise comparativa entre as médias das intensidades relativas obtidas e os resultados das regressões múltiplas feitas na amostra conjunta de obesos e não obesos.

A discussão dos resultados da amostra masculina e feminina será feita em conjunto em cada tópico mencionado.

O tamanho da amostra feminina é inferior ao da masculina, bem como o número de variáveis disponíveis para análises. Isso se deve ao fato de a amostra do projeto inicial ser composta apenas por homens. No entanto, devido aos resultados obtidos no decorrer do trabalho terem sido diferentes dos encontrados em literatura pertinente, que trata quase que exclusivamente de mulheres, fez-se necessário acrescentar mulheres a essa amostra, com o objetivo de ampliar e adequar o estudo para discussões e comparações.

7.1 INVESTIGAÇÃO DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE

De uma amostra de 145 homens obesos, em 7,6% dos indivíduos não foi detectada pelo menos uma das bandas da BChE (G1, G1-ALB e G2); já nos controles (N = 133), essa frequência foi de 31,58%. Na Tabela 5 pode-se ver, em maiores detalhes, as frequências de não detecção de cada banda em ambos os grupos. Nota-se que estes diferem significativamente, sendo a ausência mais elevada no grupo controle.

Na amostra feminina, de um total de 56 obesas, a não detecção das bandas G1-ALB e/ou G2 foi observada em 10,71%, e no grupo controle, que também é composto por 56 mulheres, esse valor foi de 21,43%. A Tabela 17 mostra as frequências da ausência dessas bandas nos dois grupos. Nela é observado que não

há diferença estatisticamente significativa entre os grupos, no entanto observa-se que há uma tendência da não detecção ser maior nos controles.

Sendo assim, vê-se que tanto nos homens como nas mulheres, a ausência dessas bandas segue o mesmo sentido, ou seja, é maior no grupo controle.

A falta de significância estatística na análise da amostra feminina pode ser explicada, provavelmente, pelo pequeno tamanho da amostra.

Alcântara *et al.* (1999) observaram ausência da banda G1-ALB (31%) apenas nos obesos, em amostra predominantemente de mulheres. Comparando esse dado com os de mulheres e de homens obesos do presente trabalho, as diferenças são estatisticamente significativas, quando examinadas pelo teste exato de Fisher ($p < 0,02$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Essas diferenças podem refletir proporções etiológicas diferentes de obesidade nas duas amostras. No presente estudo, foram obesas selecionadas de doadores de sangue e, no caso de Alcântara *et al.*, (comunicação pessoal) foram principalmente obesas submetidas a tratamento e provenientes do Ambulatório de Obesidade do Hospital de Clínicas. O material de Alcântara *et al.* (comunicação pessoal) parece ser constituído por obesidade mais precoce e de tipo mais grave. Os autores justificaram a maior ausência do complexo G1-ALB em obesos devidos aos altos níveis de ácidos graxos livres no sangue de obesos, a maioria ligados à albumina, de certa forma diminuindo a possibilidade de ligação desta com a forma monomérica da BChE.

Quando se comparam dados de obesas do presente trabalho em relação às médias de idade e de IMC ($39,04 \pm 9,95$; $33,43 \pm 2,70$, respectivamente) com dados de Alcântara *et al.* (comunicação pessoal, 2008: $35,70 \pm 9,87$; $39,56 \pm 5,91$, respectivamente), referentes apenas a 97 obesas dos dados antes publicados, observam-se diferenças significativas entre as duas amostras: $t = 2,01$, $p < 0,05$ e $t = 8,76$, $p < 0,01$, respectivamente.

O valor zero, para intensidade de banda, foi algumas vezes atribuído pelo próprio programa (*KODAK 1D Image Analysis Software*) e, outras vezes, seguiu um critério. Nesse último caso, o critério adotado para se considerar uma banda ausente dependeu de um valor mínimo ($\leq 0,003$) dado pelo programa, uma vez que o menor valor registrado por Alcântara *et al.* (comunicação pessoal) foi superior a 0,003. Uma amostragem de registros inferiores a 0,003 foi verificada visualmente e se percebeu que, em vários casos, não se observava banda, o que indicou um problema de resolução do programa, que confunde o fundo da placa com banda.

Se na padronização da técnica tivesse sido estipulado um volume maior de amostra a ser aplicada no gel, provavelmente casos em que não apareceram bandas poderiam mostrar banda de pouca intensidade, significando que os resultados obtidos se referem às condições específicas dessa metodologia. Indivíduos com valor zero para uma dessas bandas podem apresentá-la em quantidade muito reduzida no soro.

Contudo, a metodologia padronizada para as condições da eletroforese, as concentrações do gel, bem como a quantidade de amostra aplicada no gel, foi a que melhor atendeu aos requisitos necessários para a realização da leitura do gel pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software* e, conseqüentemente, para a realização deste trabalho. Com maior volume de amostra, os testes mostraram bandas borradas e muitos rastros na placa de gel de poliacrilamida.

7.2 RELAÇÕES ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE

Nas Tabelas 11 e 12 (Figuras de 13 a 24) podem-se observar as correlações entre as intensidades relativas das bandas G4, G2, G1-ALB e G1, nos homens obesos e controles, respectivamente. As Tabelas 23 e 24 mostram os respectivos dados em mulheres. Nos dois sexos, essas correlações apresentam sentidos e valores de r semelhantes na maioria das correlações.

Quando os resultados obtidos em homens e mulheres são comparados, chama atenção a correlação sempre negativa de G4 com as demais bandas e a correlação positiva entre G2 e G1-ALB. Em geral, não há correlação de G1 com G2 e de G1 com G1-ALB, com exceção de homens não obesos, quando essas correlações são positivas significativamente.

Alcântara (2000a) observou que o tetrâmero da BChE (G4) diminui sua atividade, com a estocagem, ao mesmo tempo em que complexos de menor mobilidade eletroforética se tornam mais evidentes, provavelmente em consequência da ligação de G4 com outras moléculas. Evidências semelhantes sobre o efeito da estocagem, com aumento relativo das bandas com menor mobilidade eletroforética que G4, acompanhado por uma diminuição da intensidade de G4, foram também relatadas por Juul (1967) e Harris *et al.* (1962). No caso do presente estudo, esses complexos de menor mobilidade eletroforética não são observados, devido às

condições de concentração do gel de poliacrilamida, as quais não são próprias para tal separação, no entanto, observou-se um aumento na intensidade relativa de bandas de maior mobilidade, como o monômero e monômero ligado à albumina nos obesos.

Masson (1979), analisando parâmetros moleculares das bandas da butirilcolinesterase, inferiu que o monômero representa uma subunidade que serve de base constitutiva para as outras formas, e que o monômero, dímero e tetrâmero são parcialmente interconversíveis. Quando a butirilcolinesterase, em seu estado nativo, é tratada com tripsina, obtêm-se quatro produtos que apresentam mobilidades iguais às bandas que ocorrem naturalmente (monômero, dímero, trímero e tetrâmero) de acordo com Lockridge *et al.* (1982). O monômero associado à albumina, quando tratado com tripsina, é convertido a um produto semelhante ao monômero e essa conversão é acompanhada por um aumento na atividade da BChE, provavelmente devido à liberação de um impedimento exercido pela albumina sobre a sub unidade da BChE, que interferia em sua atividade catalítica (MASSON, 1989).

A atividade da BChE da amostra masculina, obtida no banco de dados do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, apresenta média significativamente maior nos obesos ($6,40 \pm 2,82$ KU/l) do que em controles ($4,55 \pm 1,29$ KU/l), sendo $t = 7,159$; $p < 0,0001$.

7.3 RELAÇÕES ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE E AS VARIÁVEIS ANALISADAS

Na análise de correlação feita entre as intensidades relativas das bandas da BChE e as demais variáveis (idade, IMC, atividade da BChE, exon 1 e exon 4 do gene *BCHE* e gene *GRHL*), em homens obesos, obteve-se coeficiente de correlação significativo entre G4 e atividade da BChE, entre G4 e gene *GHRL*, e entre G1 e a atividade da BChE. Verificou-se que a atividade da BChE está associada negativamente com a intensidade relativa de G4 e positivamente com a da G1, enquanto a intensidade relativa de G4 é menor no grupo de genótipo LM+MM de *GHRL* do que no LL. Segundo estudo realizado por Dantas (2008), foi obtida correlação entre a atividade da BChE e a variação *L72M* do gene *GHRL*, na amostra

de obesos, mostrando tendência da variante *M* estar associada com atividade mais alta da BChE.

No grupo controle, houve correlação estatisticamente significativa negativa, apenas de G4 com a atividade da BChE.

Alcântara *et al.* (2005) observaram associação entre a atividade total, atividade relativa e atividade absoluta das bandas $C_{4/5}$ e C_{OF} (banda formada pelas demais bandas da BChE), com síndrome metabólica (SM) e com variáveis relacionadas a essa síndrome. No grupo dos obesos de genótipo *CHE2 C5-*, quanto ao loco *CHE2*, a atividade da BChE dessas bandas foi maior no grupo com síndrome metabólica. Essas atividades não se comportam como fatores de risco independentes da SM, mas podem ser consideradas como indicadores secundários para a SM em obesos de fenótipo *CHE2 C5-*.

No intuito de verificar quais correlações seriam mantidas no presente estudo, quando essas variáveis fossem consideradas concomitantemente, foram feitas análises de regressão múltipla escalonada na amostra masculina, tendo como variáveis dependentes as intensidades relativas das bandas G4, G2, G1-ALB e G1, e como variáveis independentes a idade, IMC, atividade da BChE, exons 1 e 4 do gene *BCHE* e gene *GHRL*.

Nos homens obesos, obteve-se coeficiente de regressão negativo significativo da banda G4 com a atividade da BChE, mostrado na Tabela 13. Com esse resultado pode-se verificar que, à medida que a atividade da BChE aumenta, ocorre diminuição da intensidade relativa da banda G4 dessa enzima. Considerando que a variável gene *GHRL* entrou no mesmo modelo, bem próximo do nível de significância, de certa forma concordando com os dados obtidos pelas correlações simples, isso mostra a independência da relação dessas variáveis com G4.

No grupo controle, a banda G4 também está correlacionada negativamente com a atividade da BChE, e tende a ser menos intensa nos genótipos com a variante -116A do exon 1 do gene *BCHE* e mais intensa nos genótipos com a variante 539T desse mesmo gene (Tabela 14), desde que se considerem as contribuições dadas pelas variáveis que entraram antes nesse modelo de regressão. Esse resultado mostra a importância da relação dos exons 1 e 4 do gene BChE com a banda G4, que não tinha sido detectada com a análise de correlação simples.

No estudo desenvolvido por Andrade *et al.* (2008), que analisou a relação de três classes genóticas referentes aos exons 1 e 4 do gene *BCHE*

(-116GG;539AA, -116GG;539AT e -116GA;539AT) com o IMC, foi mostrado que a associação com a variância maior do IMC ocorre apenas na presença da variante -116A (genótipo -116GA;539AT) e que a variante *K* isolada não está relacionada com esse efeito.

Furtado *et al.* (2008), examinando a frequência da variante -116A e a relação dos genótipos -116GG;539AA, -116GG;539AT e -116GA;539AT com a atividade da BChE, mostraram que a variante *K* (539T) sozinha não está associada com a diminuição da atividade, sendo a variante -116A necessária para ocorrer essa diminuição, provavelmente por afetar a transcrição ou tradução do gene *BCHE*.

Para mostrar quanto de atividade absoluta (KU/l) as diferentes bandas apresentam, foi utilizada a média da atividade da BChE no plasma (AT; obtida do banco de dados do Laboratório de Polimorfismo e Ligação) multiplicada pela média da intensidade relativa de cada banda (IR), conforme Tabela 26. Esses dados mostram que a obesidade é acompanhada de maior síntese da BChE e também de maior degradação de G4 no plasma, sendo que em todas as formas moleculares os obesos mostram maior atividade absoluta da BChE do que os controles.

TABELA 26 – VALORES DE MÉDIAS DE ATIVIDADE ABSOLUTA EM KU/l (AA) DE CADA BANDA DA BUTIRILCOLINESTERASE, OBTIDOS DA MULTIPLICAÇÃO DA ATIVIDADE DESSA ENZIMANO PLASMA PELA INTENSIDADE RELATIVA (IR)

	OBESOS		NÃO OBESOS	
	IR	AA ± DP	IR	AA
G4	0,629	4,35 ± 1,93	0,768	3,45 ± 1,16
G2	0,039	0,26 ± 0,23	0,033	0,16 ± 0,14
G1-ALB	0,081	0,54 ± 0,44	0,065	0,31 ± 0,35
G1	0,188	1,25 ± 1,05	0,133	0,63 ± 0,57

Devido a pouca informação disponível na amostra feminina, para esse tipo de análise, fez-se apenas análise de correlação simples entre as intensidades relativas das bandas e as variáveis idade e IMC. Obteve-se correlação significativa somente no grupo controle entre G1 e idade, de sentido positivo. Alcântara *et al.* (1999), em estudo de amostra predominantemente de mulheres, verificaram coeficientes de correlação significativos apenas no grupo controle, entre a atividade relativa das bandas e o IMC: G1 (+), G2 (-) e G1-ALB (-).

7.4 INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE E OBESIDADE

Foram feitas análises de regressão múltipla escalonada, unindo-se os grupos de obesos e controles, dentro de cada sexo, no sentido de avaliar as relações das bandas com as variáveis estudadas, levando-se em conta a presença ou ausência de obesidade. Assim, pode-se verificar se as diferenças entre as médias das intensidades relativas das bandas, registradas nas Tabelas 6 e 18, se devem à obesidade ou a outra variável.

Em homens, obesidade entra como variável independente significativa apenas no caso das intensidades relativas de G4 e de G1, em sentido negativo e positivo, respectivamente, confirmando os dados da Tabela 6. Em ambos os modelos mais econômicos de regressão múltipla, a variável independente atividade da BChE foi a que primeiro entrou na análise, mostrando correlação negativa com G4 e positiva com G1. A intensidade relativa de G2 não mostrou diferença média em obesos e controles (Tabela 6) e a única variável independente significativa foi a atividade da BChE.

No caso de G1-ALB, que na Tabela 6 mostra resultado significativo limítrofe entre obesos e controles, a análise de regressão múltipla não mostrou correlação de G1-ALB com a obesidade. A única variável significativa é a atividade da BChE, que deve ser a responsável pelo resultado significativo desta tabela, uma vez que esses obesos mostram atividade da BChE significativamente mais elevada do que os controles ($t = 7,159$; $p < 0,0001$). Neste caso, a variável obesidade não se mostrou independente da variável atividade da BChE.

Levando-se em conta que a intensidade de G1-ALB está positivamente correlacionada com a atividade da BChE, e que obesos apresentam média de atividade da BChE maior do que controles, é de se esperar que tenha sido detectada menor frequência de falta de detecção de G1-ALB em obesos do que em controles.

Considerando-se os dados obtidos na amostra total de homens, observa-se que a atividade da BChE é a única variável que está sempre associada com a intensidade relativa das bandas da BChE. No caso de G4, os dados sugerem que tanto a atividade mais alta da BChE, como as alterações metabólicas relacionadas com a obesidade estão associadas com maior degradação desta banda, processo que parece depender da ação de proteases (LOCKRIDGE *et al.*, 1982).

No grupo de mulheres, a regressão múltipla escalonada considerou apenas duas variáveis independentes: idade e obesidade. Sempre a obesidade esteve significativamente associada com as bandas: G4 (-), G2 (+), G1-ALB (+) e G1 (+), confirmando os dados da Tabela 18. No caso da intensidade relativa de G1, a variável idade também mostrou correlação significativa positiva (Tabela 25). Como não se contou com informação a respeito da atividade da BChE, na amostra das mulheres, é possível que a introdução dessa variável viesse a causar efeito semelhante ao que ocorreu com a análise masculina, isto é, se mostrasse de maior importância do que a própria obesidade, na relação com a intensidade das bandas da BChE.

Os dados de intensidade relativa das bandas da BChE obtidas no presente trabalho indicam uma maior degradação de G4 em indivíduos com atividade alta da BChE em relação aos com atividade baixa desta enzima, ainda aumentada no caso da presença de obesidade. Assim propõe-se, que os mecanismos fisiológicos da obesidade predisponham para essa maior degradação da BChE. Além disso, é possível que outros distúrbios associados com atividade alta também sejam responsáveis por maior degradação da BChE.

As correlações negativas independentes das variáveis atividade da BChE e obesidade com G4, e positivas com G1, aliadas à correlação negativa entre G4 e G1, parecem indicar que a associação positiva entre obesidade e atividade da BChE, verificada em vários estudos, devida provavelmente a maior síntese dessa enzima, é acompanhada de maior degradação do tetrâmero em monômeros em obesos do que em não obesos.

8 CONCLUSÕES

- O estudo das bandas G4, G2, G1-ALB e G1 da butirilcolinesterase mostrou que os não obesos apresentaram maior ausência de bandas quando, comparados aos obesos, na amostra masculina.
- Obteve-se, em homens e mulheres, tanto obesos como controles, um padrão de correlação entre as intensidades relativas dessas bandas, sendo o coeficiente de correlação sempre negativo, entre G4 e as demais bandas, e sempre positivo entre G2 e G1-ALB.
- As análises de regressão múltipla escalonada, feitas com a amostra masculina, mostraram correlação negativa da intensidade relativa de G4 com a atividade da BChE em obesos e não obesos. Observou-se também que a intensidade relativa de G4 diminui na presença da variante -116A e aumenta na presença da variante 539T, ambas do gene *BCHE*, somente no grupo controle.
- Quando homens obesos e não obesos foram considerados como uma amostra total, análises de regressão múltipla mostraram que a obesidade e a atividade da BChE apresentam correlações independentes com G4 (-) e com G1 (+). Tanto G2 como G1-ALB não apresentaram correlação com a obesidade, mas apenas com a atividade da BChE (+).
- Nas mulheres, a análise de regressão múltipla escalonada realizada na amostra total (obesas + não obesas), mostrou correlações independentes positivas entre a intensidade relativa de G1 com idade e com obesidade. A banda G4 apresenta correlação negativa com a obesidade e as bandas G2 e G1-ALB estão correlacionadas positivamente com a obesidade.
- As correlações negativas independentes das variáveis atividade da BChE e obesidade com G4, e positivas com G1, aliadas à correlação negativa entre G4 e G1, parecem indicar que a associação positiva entre obesidade e atividade da BChE, verificada em vários estudos, devida provavelmente a maior síntese dessa

enzima, é acompanhada de maior degradação do tetrâmero em monômeros em obesos do que em não obesos.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, V. M. **Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímicos-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR.** Tese de Doutorado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000a.
- ALCÂNTARA, V. M.; CIPRIANI, T.; RÉA R; SUPPLY, H.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). **Genet. Mol. Biol.** 22 (supl.): 213, 1999.
- ALCÂNTARA, V. M.; CIPRIANI, T.; RÉA R; SUPPLY, H.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Banda C₂ da butirilcolinesterase em obesos. **Genet. Mol. Biol.**, 23 (supl.): 622, 2000b.
- ALCÂNTARA, V. M.; CIPRIANI, T.; RÉA R; SUPPLY, H.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Deficiência do complexo butirilcolinesterase: albumina associada com fatores de risco para doença arterial coronariana em obesos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** (supl.), vol. 33(2), 2001a.
- ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPPLY, H. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. **Int. J. Obes.** v.27, p. 1557-1564, 2003.
- ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPPLY, H. L. CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 43(3), p 285-288, 2005.
- ALCÂNTARA, V. M.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, L. C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum. Biol.**, v. 73, p. 587-595, 2001b.
- ALLES, G. A.; HAWES, R. C. Cholinesterases in the blood of man. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 133, p 375-390, 1940.
- ALTAMIRANO, C. V.; BARTELS, C. F.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild ntype enzyme. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 869-877, 2000.
- ANDRADE, F. A.; FURTADO, L.; SOUZA, R. L. R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of the -116A variant of the BCHE gene of butyrylcholinesterase with body mass index. **Chem. Biol. Interact.**, 2008 (submetido à publicação).
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K. P.; BARTELS, C. F.; LA DU, B. N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- BARTELS, C. F.; JENSEN, F. S.; LOCKRIDGE, O.; WAN DER SPEK, A. F. L.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T.; LA DU, B. N. DNA mutation associated with the

human butyrylcholinesterase K-variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1086-11103, 1992.

BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L. E LA DU, B. N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PRIMO-PARMO, S. L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M. A. C. E VIEIRA, M. M. The C₅ isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, v. 41, p. 330-339, 1991.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. E SOUZA, R. L. R. Butyrylcholinesterase - a still mysterious enzyme. In **Fifty Years of Human Genetics. A Festschrift and liber amicorum to celebrate the life and work of George Robert Fraser**. Edits. Oliver Mayo e Carolyn Leach. Wakefield Press, Austrália, p. 584, 2007.

CIPRIANI, T. R.; ALCÂNTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Estudo das diferentes bandas da BChE com relação ao índice de nutrição. In: **Evento de Iniciação Científica da UFPR**, VII, Curitiba, 1999.

DANTAS, V. G. L. **Estudo de associação de variações dos genes *BCHE* (butirilcolinesterase) e *GHRL* (grelina) com obesidade**. Dissertação de mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

DATE, Y.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAWAGUCHI, A.; MONDAL, M. S.; SUGANUMA, T.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. **Endocrinology**, v. 141: p. 4255–4261, 2000.

DE VRIESE, C.; GREGOIRE, F.; LEMA-KISOKA, R.; WELBROECK, M.; ROBBERECHT, P.; DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology**, v. 145, p. 4997-5005, 2004.

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. E HODGES, L. K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 24, p. 58-64, 1972.

DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS E OBESIDADE: ESTRATÉGIA MUNDIAL SOBRE ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL, ATIVIDADE FÍSICA E SAÚDE. 2003, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em <http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf>, acessado em 12/11/2007.

EVANS, R.T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 1762-1766, 1978.

FROGUEL, P.; GUY-GRAND, B.; CLEMENT, K. Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome. **Presse Med.**, v. 29, p. 564-571, 2000.

FURTADO, L. **Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade**. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005. Disponível em: <<http://genetica.bio.ufpr.br/posgraduacao/index.htm>>

FURTADO, L.; NUNES, K.; MIKAMI, L.; SOUZA, R. L. R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of the -116A variant of the *BCHE* gene to lower mean butyrylcholinesterase activity. **Chem.-Biol. Interact.** (submetido à publicação).

GUALILLO, O.; LAGO, F.; CASANUEVA, F. F.; DIEGUEZ, C. One ancestor, several peptides Post-translational modifications of preprogrelin generates several peptides with antithetical effects. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 256, p. 1-8, 2006.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical, 1980.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A E ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-1298, 1962.

JBILLO, O.; TOUTANT, J. P.; VATSIS, K. P.; CHATONNET, A. LOCKRIDGE, O. Promoter and transcription start site of human and rabbit butyrylcholinesterase genes. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 20829-20837, 1994.

JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. **Clin. Chim. Acta**, v. 19, p. 205-13, 1968.

KALLOW, W.; GUNN, D. R. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. **Ann. Hum. Genet.**, London, v. 23, p. 239-250, 1959.

KODAK 1D IMAGE ANALYSIS SOFTWARE, versão 3.5, 2000.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.12, p. 118-122, 2001.

KUTTY, K.M. Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, v. 13, p. 239-43, 1980.

LA MOTA, R. V.; MCCOMB, R. B.; NOLL J R.; WETSTONE, H. J.; REINFRANK, R. F. Multiples forms of serum cholinesterase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 124, p. 299-308, 1968.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12012-12018, 1982.

LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C K.; NORTON, S.E. E JOHNSON, L.L. Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 549-557, 1987.

MASSON, P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 578, p. 493-504, 1979.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 988, p. 258-266, 1989.

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In **Massoulié j. et al. cholinesterases: structure, function, mechanisms, genetics and cell biology**. eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.

MCGUIRE, M. C.; NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LOCKRIDGE, O. LA DU, B. N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 953-57, 1989.

MIKAMI, L. R.; WIESELER S, SOUZA R. L.R.; SCHOPFER L. M. NACHON F.; LOCKRIDGE, O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics** (no prelo).

National center for biotechnology information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>, acessado em 02/08/2006.

NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 353-362, 1962.

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHO CIENTÍFICO, Universidade Federal do Paraná, 2ªed, Curitiba, 2007.

PERUSSE, L.; RANKINEN, T.; ZUBERI, A.; CHAGNON, Y. C.; WEISNAGEL, S. J.; ARGYROPOULOS, G.; WALT, B.; SNYDER, E. E. BOUCHARD C. The Human Obesity Gene Map: The 2004 Update. **Obes. Res.**, v. 13, p. 381-490, 2005.

PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES 2002-2003, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002/default.shtm>> acessado em 20/09/2006.

PRIMO-PARMO, S. L. **Caracterização de nove alelos silenciosos novos da butirilcolinesterase humana a nível de ADN**. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1993.

RUBINSTEIN, H. M.; DIETZ, A. A.; LUBRANO, T. E1^K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, v. 15, p. 27-29, 1978.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory**

Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press USA, 1989.

SMITH, R. G.; VAN DER PLOEG, L. H.; HOWARD, A. D.; FEIGHNER, S. D.; CHENG, K.; HICKEY, G. J.; WYVRATT, M. J. Jr; FISHER, M. H.; NARGUNS, R. P.; PATCHETT, A. A.; Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. **Endocr. Rev.**, v. 18, p. 621-645, 1997.

SOUZA, R. L. R; CASTRO, R. M. V.; FREUND, A. A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. **Hum. Biol.**, v. 70, p. 965-70, 1998.

SOUZA, R. L. R.; FURTADO, L.; DINIZ, A. C. P.; SILVA, A. C. D.; KAISS, J.; PETZLER, M. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Studies on a heterologous complex formed by human butyrylcholinesterase. **Biochem. Genet.**, New York, v. 41, p. 141-150, 2003.

SOUZA, R. L. R; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K. V.; FURTADO, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 326, p. 329-334, 2005a.

SOUZA, R. L. R; MIKAMI, L. R.; MAEGAWA, R. O. B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, v. 84, p. 349-353, 2005b.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1cd. Disponível em < <http://www.statsoft.com>>.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 19, p. 1607-1615, 2000.

TANAKA, M.; HAYASHIDA, Y.; IGUCHI, T.; AKAN, N.; NAKAI, N.; NAKASHIMA, K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. **Endocrinology**, v. 124, p. 3697-3700, 2001.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E. E.; CHAGNON, M.; SJÖSTRÖM, L.; BOUCHARD, C.; Mutations in the Preproghrelin / ghrelin gene associated with obesity in human. **J. of Clin. Endocrinol.**, v. 86(8), p. 3996-3999, 2001.

WEITNAUER, E.; EBERT, C.; HUCHO, F.; ROBITZKI, A.; WEISE, C.; LAYER, P. G. Butyrylcholinesterase is complexed with transferring in chicken serum. **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, p.205-214, 1999.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F.; LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-551, 1947.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, v. 35, p. 174-197, 1980.